

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1961

THÈSE

N°

579

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Jean-Claude LEGRAND

né le 17 Mars 1932 à Langres (Haute Marne)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Assistant de Biochimie à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement le 18 Juin 1959

QUELQUES ASPECTS BIOCHIMIQUES
ET PATHOLOGIQUES DE LA MELANOGENESE

Président : M. M.F. JAYLE, Professeur.

EDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE · PARIS.V^e

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1961

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Jean-Claude LEGRAND

né le 17 Mars 1932 à Langres (Haute Marne)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Assistant de Biochimie à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement le : 18 Juin 1959

QUELQUES ASPECTS BIOCHIMIQUES
ET PATHOLOGIQUES DE LA MELANOGENESE



Président : M. M.F. JAYLE, Professeur.

EDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE . PARIS-V^e

WELLS

THREE

NO. 11

THE GREAT EN

CHURCH

IN

THE CITY

OF NEW YORK

AND THE VICINITY

OF THE CITY

OF NEW YORK

AND

THE VICINITY

OF THE CITY

OF NEW YORK

OF NEW YORK

OF NEW YORK

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

PROFESSEURS

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Debré (R.), Gastinel (P.), Guillaïn (G.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN Léon BINET.
Membre de l'Institut

ASSEESSEUR. Jean VERNE.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	JAYLE (M. F.)
» » (Prof. à titre personnel)	ETTORI (J.)
» » (Prof. à titre personnel)	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
» » (Prof. à titre personnel)	BOURLIÈRE (F.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
	SIGARD (A.)
	N.
Cliniques chirurgicales	PATEL (J.)
	CORDIER (G.)
	GOSSET (J.)
	MOULONGUET (P.)
	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	GAUDART-D'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	MATHEY (J.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	DECOURT (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	LAMY (M.)
Clinique de génétique médicale (Enfants-Malades)	FUNK-BRENTANO (P.)
Clinique gynécologique (Broca)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	DELAY (J.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (St-Anne)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	N.
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	LENÈGRE (J.)
	SOULIÉ (P.)
	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Cliniques médicales	BROUET (G.)
	BARIÉTY (M.)
	DREYFUS (G.)
	KOURILSKY (R.)
	DEBRAY (G.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	GENNES (L. de)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GEROT (M.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DAVID (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	GARGIN (R.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	LACOMME (M.)
	MERGER (R.)
Cliniques obstétricales	VARANGOT (J.)
	RENARD (G.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	AUBRY (M.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	LELONG (M.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	MARIE (J.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent-de-Paul)	BERNARD (E.)
Clinique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades)	MICHAUX (L.)
Clinique de pneumo-ptysiologie (Laënnec)	COSTE (F.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	N.
Clinique stomatologique (Pitié)	LEMAIRE (A.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	N.
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine)	GIROUD (A.)
Clinique urologique (Cochin)	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
Embryologie	SÈZE (S. de)
» » (Prof. à titre personnel)	VERNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	
Histologie	

Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	MM.	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)	
» » (Prof ^r à titre personnel)	DEPARIS (M.)	
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)	
Médecine légale	PIÉDELIEVRE (R.)	
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)	
Parasitologie	GALLIARD (H.)	
» (Prof ^r à titre personnel)	BRUMPT (L. C.)	
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)	
» » (Prof ^r à titre personnel)	LAURENCE (G.)	
Pathologie exotique	LAVIER (G.)	
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)	
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)	
Pathologie respiratoire	TURIAF (F.)	
Pathologie et thérapeutiques générales	BOUDIN (G.)	
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)	
» (Prof ^r à titre personnel)	LÉVY (Mlle J.)	
Physiologie	BINET (L.)	
» (Prof ^r à titre personnel)	BARGETON (D.)	
» » »	PARROT (J.)	
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)	
Physique médicale	DOGNON (A.)	
» » (Prof ^r à titre personnel)	DJOURNO (A.)	
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)	
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	LÉGER (L.)	
Thérapeutique	CONTE (M.)	

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAÎTRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.		MM.
Anatomie	{ CABROL (C.) COUINAUD (C.) OLIVIER (G.)	Ophtalmologie	{ BRÉGEAT (P.) SARAUX (H.)
	{ GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch.	Orthopédie	{ JUDET (R.) RAMADIER (J.)
Anatomie pathologique	{ BUSSET (F.) GOUYGOU (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)	Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)	Parasitologie	CHABAUD (A.)
Bactériologie	{ BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) TOURNIER (P.)		{ BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUGHOIX (J.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUROST (Cl.) FAUREL (J.)
Biochimie médicale	{ DESGREZ (P.), pr. s. ch. POLONSKI (J.), m. conf.	Pathologie chirurgicale	{ FLABEAU (F.) GERMAIN (A.) LOYGUE (J.) MERCADIER PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)
Biologie appliquée à l'Éducation Physique et aux Sports	PLAS (F.)	Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Carcinologie	{ DENOIX (P.) MATHE (G.)	Pathologie expérimentale	{ CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LÉPER (J.) MAURICE (J.) RICHEL (G.) AUSSANNAIRE (M.) BOUR (H.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISSAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CASTAGNE (P.), m. conf. CATINAT (J.) CONTAMIN (F.) COURY (G.) FREZAL (J.) HOUSSET (E.) LAROCHÉ (O.) LESOBRE (R.) MACREZ (G.) NICK (J.) PEQUIGNOT (H.), pr. s. ch. ROYER (P.) WOLFROMM (R.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT (B.)		
Electro-Radiologie	LEDoux-LEBARD (G.)		
Hématologie	{ BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.) COUJARD (R.), pr. s. ch.		
Histologie	{ MAROIS (M.) RACADOT (J.)		
Hydrologie	CORNET (A.)		
Hygiène	{ BOYER (J.), pr. s. ch. CORRE-HURST (Mlle L.)		
Maladies infectieuses	{ BASTIN (R.) DUPONT (V.) DEROBERT (L.), pr. s. ch.		
Médecine légale	{ HADENGUE (A.) FOURNIER (E.) GUENIOT (M.)		
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)		
Neurologie	LHERMITTE (F.)		
Obstétrique	{ GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) THOYER-ROZAT (J.)		

	MM.		MM.
Pédiatrie-Puériculture . . .	JOSEPH (R.)	Pneumo phtisiologie . . .	KREIS (B.)
	MANDE (R.)	Psychiatrie	PICHOT (P.)
	NOZZICONAGGI (P.)	Psychiatrie infantile . . .	DUCHÊ (D.)
	POLONOVSKI (G.)	Rhumatologie	DELBARRE (F.)
	ROSSIER (A.)		
Pharmacologie	BOISSIER (J.)	Stomatologie	GERNÉA (P.)
	LECHAT (P.)		CHAPUT (M ^{me} A.), m. c. 3 ^{gr.}
Physiologie	DEJOURS (P.)		GRELLET (M.)
		Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)
Physique médicale	GOUGEROT (L.), m. conf.		LAMOTTE (M.)
	pr. s. ch.	Urologie	QUENU (L.)
	KELLERSHOHN		

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE	Clinique obstétricale . . .	GRASSET (J.)
Clinique chirurgicale . . .	ABOULKER (P.)		MAYER (M.)
	ABELINE (A.), pr. s. ch.		RAVINA (J.)
	HUGUIER (J.)	Clinique ophtalmologique .	DESIGNES (P.)
	OLIVIER (G.)		OFFRET (G.)
	PADOVANI (P.)	Clinique oto-rhino-laryngo-	
	POILLEUX (F.)	logique	MADURO (R.)
	ROUX (M.)	Clinique pédiatrique et pué-	
Clinique médicale	VERNE (J.-M.)	riculture	LAPLANE (R.)
	DOMART (A.)	Clinique psychiatrique. . .	BARUK (H.)
	PERRAULT (M.)	Clinique urologique . . .	KUSS (R.)
	RAMBERT (P.)	Médecine légale	GAULTIER
	THIEFFRY (S.)		

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. — CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE : BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté . .	M. LENA (J.)
Secrétaires	M ^{me} BEURLAND (H.), M ^{me} SAINTREUIL (G.), M ^{me} ROCHE (L.)
Conservateur en Chef	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur	Mlle DUMAITRE (P.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.),
	Milles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A la mémoire de mon père

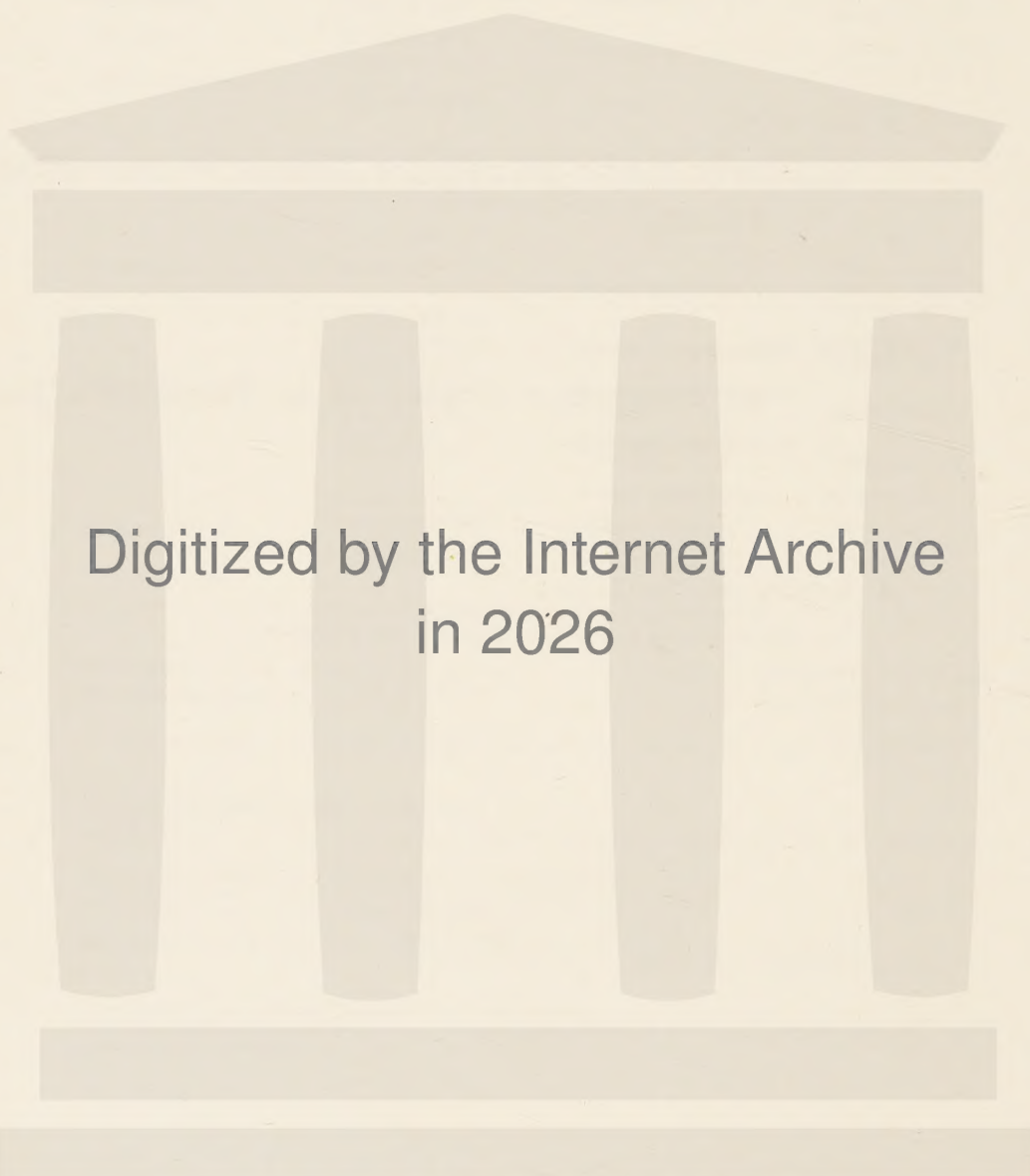
A ma mère,

avec toute ma reconnaissance et mon affection
filiale

A ma femme,

ma camarade d'études et ma compagne affectueuse
dans la vie

A toute ma famille.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547118_0033

A mon Président de thèse,

Monsieur le Professeur Max Fernand JAYLE :

Monsieur, ne veuillez considérer dans ce modeste travail dont vous avez accepté si aimablement la présidence, que mon désir de persévérer dans une carrière scientifique.

A Monsieur le Professeur Agrégé GONNARD

Avec mes vifs remerciements pour m'avoir
accueilli dans son laboratoire, m'avoir initié
aux techniques et guidé tout le long de ce travail.

Au Docteur C. GRUPPER

Médecin-Assistant des Hôpitaux de Paris,
qui m'a inspiré ce travail et fourni les différents
serums de cette expérimentation. Avec mes plus sin-
cères remerciements et toute ma gratitude.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux :

- Professeur R. COUVELAIRE
- Professeur M. COMTE
- Docteur BENDA
- Docteur R. WORMS
- Docteur de GRACIANSKY.

ENTREE EN MATIERE

QUELQUES ASPECTS BIOCHIMIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA MELANOGENESE.

La formation au niveau des mélanocytes cutanés du pigment mélanique implique une série de réactions biochimiques d'oxydation qui partent d'un substrat phénolique et qui aboutissent à un corps polymérisé, la mélanine.

Par son mécanisme même, la mélanogenèse est du ressort biochimique, mais par son siège et sa pathologie variée elle intéressera aussi le dermatologue.

Nous avons voulu dans ce travail réunir ces deux aspects du problème :

- Aspect chimique, en reprenant les différents modes d'oxydation de la tyrosine et de la dihydroxyphenyl-alanine, substrats initiaux de la mélanogenèse, et en étudiant l'action du serum sur ces différentes oxydations.
- Aspect clinique, en recherchant à la suite de notre maitre C. GRUPPER des modifications du comportement du serum sur l'oxydation de ces substrats dans le cas de sujets porteurs de mélanomes.

1ère PARTIE

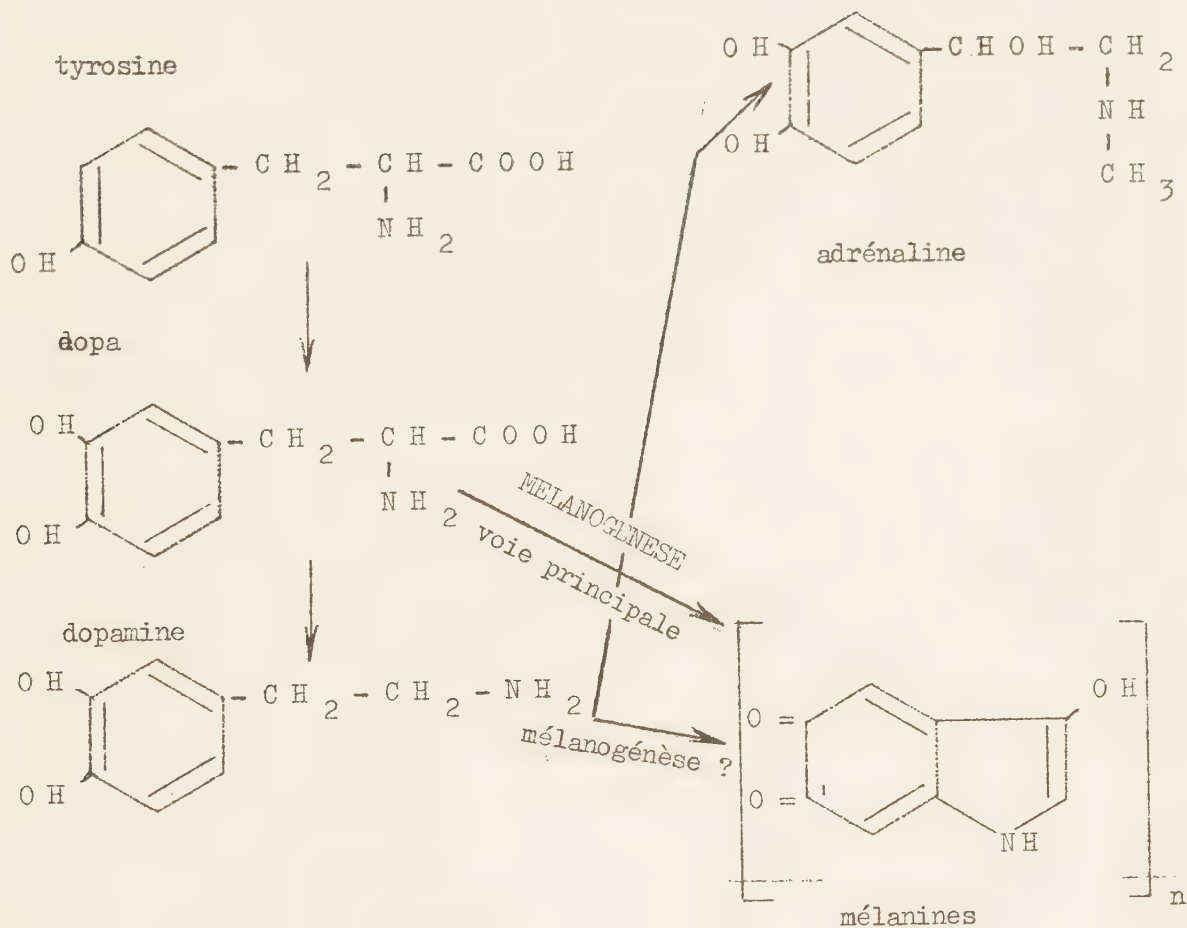
CHAPITRE I

LES SUBSTRATS INITIAUX DE LA MELANOGENESE

Si plusieurs composés cycliques phénoliques peuvent par oxydation donner des mélanines, nous ne considérerons comme substrats biologiques initiaux que deux d'entre eux, la tyrosine et la dihydroxyphenylalanine.

La tyrosine qu'elle soit sous forme d'acide aminé libre ou sous forme de peptides et même de protéines est le substrat primordial. Largement repandue dans la peau et dans tout l'organisme, son métabolisme est étroitement uni à son dérivé d'oxydation nucléaire, la dihydroxyphenylalanine ou dopa.

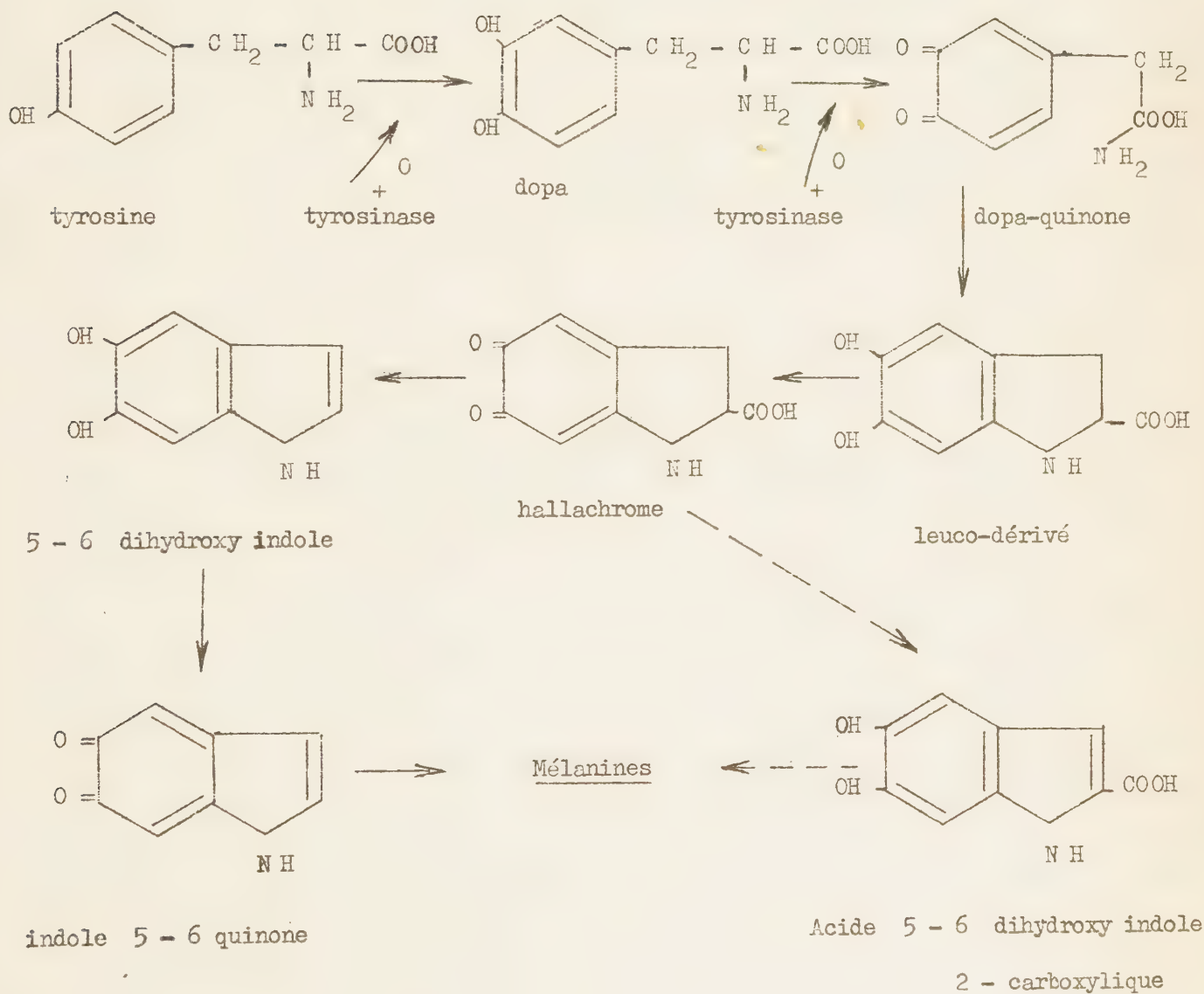
Contrairement à la tyrosine, la dopa n'a été que rarement retrouvée dans les tissus biologiques, mais elle doit être considérée comme un intermédiaire essentiel d'où partent les voies de l'adrenalinogénèse et de la mélanogénèse.



Ainsi deux acides aminés participent en premier à la formation du pigment mélanique :

- la tyrosine, porteur d'une fonction phénol;
- la dopa, acide aminé diphénolique.

Schéma de la mélanogenèse selon Lerner et Fitzpatrick :(1)



CHAPITRE II

LES DIFFERENTS MODES D'OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE LA DIHYDROXYPHENYLALANINE

Comme le schéma de la mélanogénèse nous l'indique, tyrosine et dopa subissent une oxydation enzymatique, mais ces deux substrats peuvent encore s'oxyder spontanément ou par voie chimique.

Avant d'étudier l'action du serum sur ces différents modes d'oxydation, voyons quelles en sont les caractéristiques.

AUTO-OXYDATION

Si la tyrosine est très lentement oxydable, la dopa, comme tout diphénol, l'est beaucoup plus facilement et la seule condition est un pH neutre ou alcalin . En pH alcalin, le noircissement est instantané.

De l'auto-oxydation de la dopa il faut rapprocher l'action des rayons ultra-violets sur la tyrosine, action découverte par ARNOW (2) (3) : une solution de tyrosine irradiée, à l'air, conduit à la formation de dopa mise en évidence par le réactif nitro-molybdique, mais une partie de la dopa est aussi détruite.

L'irradiation ultraviolette accélère d'autre part l'action de la tyrosinase sur cet acide aminé et cette réaction n'est pas éloignée du brunissage solaire.

OXYDATION PAR VOIE CHIMIQUE

Divers agents oxydent la tyrosine en dopa : outre les rayons ultraviolets, citons l'eau oxygénée, l'oxygène en présence d'acide ascorbique, système qui se comporte comme une peroxydase (4) (5), le permanganate de potassium. Ce dernier oxyde même la tyrosine des peptides et des protéines (6).

Quant à l'oxydation chimique de la dopa, elle est certes facile, mais pratiquement les agents les plus importants sont représentés par les cations divalents comme l'a montré P.GONNARD (7).

Ainsi tous les cations divalents sauf le zinc et le cadmium se comportent comme des effecteurs très spécifiques.

La tyrosine par contre doit d'abord être transformée en dopa pour subir l'action de ces cations.

OXYDATION ENZYMATIQUE

Cette voie d'oxydation est la plus importante car elle représente le mode d'oxydation biologique et fait intervenir un enzyme dont le mode d'action est particulier.

La tyrosine appartient au groupe des phénolases complexes et sa spécificité dépasse largement le groupe de la l tyrosine et de la l dopa.

Elle peut être extraite de divers végétaux ou à partir de tissus animaux. Parmi les plus importantes citons la polyphénoloxydase de pomme de terre, de champignon ou encore celles tirées du mélanome de souris ou de cheval.

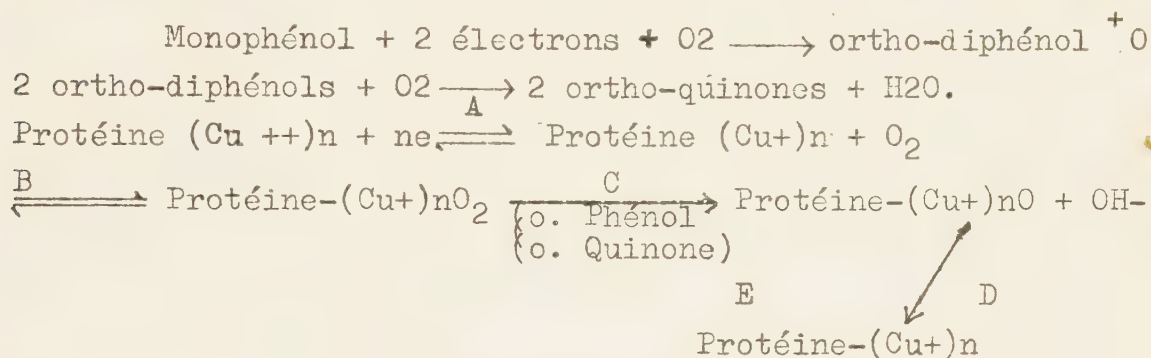
Toutes ces tyrosinases ont en commun, la présence de cuivre dans leur molécule et le blocage de celui-ci entraîne l'inactivation de l'enzyme.

D'après MASON (8), la tyrosinase capable à la fois d'oxyder tyrosine et dopa comprend deux activités :

- l'activité d'une crésolase ou phénol-ortho-hydroxylase
- et l'activité d'une ortho-diphénol-deshydrogénase ou catécholase.

Si, à partir de la tyrosine, le premier corps obtenu est un ortho-diphénol, la dopa, le produit de la seconde réaction est une ortho-quinone, la dopaquinone.

Schématiquement on peut écrire avec MASON :



D = O. Diphénol + 2e⁻ → O. Quinone

E = Monophénol → O. Diphénol.

L'oxydation des diphénols est ainsi requise pour maintenir l'hydroxylation enzymatique des monophénols, mais d'autres agents réducteurs peuvent aussi intervenir.

Pour expliquer la dualité d'action de la tyrosinase certains auteurs ont parlé de deux enzymes distincts (9). Cependant la théorie la plus admise est celle d'un enzyme unique actif sur les mono et les diphénols et possédant deux centres actifs différents.

Quant à KERTESZ (10) il nie l'oxydation enzymatique de la tyrosine, et la fixation d'un nouvel oxhydryl sur le noyau de la tyrosine ne dépendrait que de la quinone formée.

En fait, comme l'a montré P. GONNARD (11), le véritable substrat de l'enzyme est un complexe tyrosine + dopa quinone (ou un autre dérivé d'oxydation de la dopa).

L'oxydation enzymatique de la tyrosine et de la dopa appelle quelques remarques dont on devra tenir compte dans l'exposé de nos résultats :

- Il n'y a pas une tyrosinase mais des tyrosinases, et il est bien évident qu'on peut noter des différences d'action entre une tyrosinase végétale et une tyrosinase animale. Leur spécificité est d'ailleurs prouvée par la spécificité des serums anti-tyrosinase (12).

- Active sur la tyrosine et la dopa, le temps de latence d'action de la tyrosinase est cependant plus long avec la tyrosine. C'est pourquoi dans nos expériences nous avons réduit ce temps par adjonction de quelques gamma de dopa.

- L'oxydation des mono comme des diphénoles revient à une consommation d'oxygène et c'est cette consommation que l'on mesure dans la méthode manométrique de WARBURG.

POUVOIR OXYDASIQUE DES HOMOGENATS DE TUMEURS.

De l'oxydation enzymatique de la tyrosine et de la dopa il faut rapprocher l'oxydation de ces substrats par des homogénats de tumeurs mélaniques. Les systèmes enzymatiques sont ici très spécifiques (13) et le cuivre est nécessaire à leur activité.

Pour HESSELBACH deux systèmes interviennent : le système phénolase et le système cytochrome (14). La formation de mélanines ne peut se faire qu'à partir de la dopa. A partir de la tyrosine, l'intervention de tyrosinase est alors nécessaire.

LES MODIFICATIONS DE L'OXYDATION

Nous ne donnerons pas ici une liste complète des inhibiteurs et des activateurs d'oxydation de la tyrosine et de la dopa, mais nous réduirons cette étude aux composés susceptibles d'intervenir en tant que constituant du serum humain.

SELS MINERAUX -

L'action inhibitrice des sels minéraux sur la tyrosinase est bien connue. Nous ne ferons que citer les travaux de OHNISHI (15) qui montrent que cette inhibition n'est pas uniquement due au chlorure de sodium mais à tous les sels minéraux. Ce point a une importance pratique car il faudra diluer à une concentration molaire de M/15 le tampon dans lequel est dissout tyrosine ou dopa avant d'étudier dessus l'action d'une tyrosinase. L'effet de ces sels est probablement de nature inonique.

RADICAUX SULFHYDRYLS -

Les radicaux SH , qu'ils soient sous une forme simple (SH₂) ou d'un polypeptide comme le glutathion , sont capables de s'unir au cuivre de la tyrosinase et d'en inhiber l'action oxydante.

PROTEINES -

L'action des protéines n'est pas univoque et elle sera discutée à propos de l'action du serum global sur les différents modes d'oxydation.

Notons simplement l'action catalytique de l'albumine, la caséine, des globulines sur l'oxydation cuprique de la dopa (16) et l'action inhibitrice des différentes fractions de Cohn sur l'auto-oxydation de la dopa (17).

CHAPITRE III

ROLE DU SERUM HUMAIN SUR LES DIFFERENTS MODES D'OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE LA DOPA.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la dopa pouvait être oxydée par deux voies différentes : une voie catalytique et une voie enzymatique, tandis que la tyrosine est surtout oxydée par la tyrosinase.

Le problème que nous voulons maintenant aborder est le rôle du serum humain sur l'oxydation des mono et diphénols en général et sur l'oxydation de la dopa et de la tyrosine, en particulier.

Nous avons recherché d'une part si le serum humain a un pouvoir oxydatif propre sur la tyrosine et la dopa et, d'autre part s'il intervient comme un activateur ou comme un inhibiteur de l'oxydation catalytique et enzymatique de ces deux mêmes substrats.

LE SERUM HUMAIN, AGENT D'OXYDATION DES POLYPHENOLS.

Avant d'aborder cette étude complexe, rappelons brièvement la chimie des polyphénols.

Les diphénols de beaucoup les plus importants sont classés selon la position de leurs oxhydriles :

- Ortho-diphénol, tel le pyrocatechol ou la dopa,
- Métadiphénol, tel le résorcinol
- Para-diphénol, comme l'hydroquinone.

Ces composés sont tous des réducteurs, mais les para et ortho-phénols le sont plus que le résorcinol.

Des para-diphénols nous devons rapprocher les para-diamines et ses dérivés substitués :

- para-phénylène diamine
- para-diméthyl - phénylènediamine

dont les fonctions amines sont facilement transformées en fonctions oxhydriles.

L'activité polyphénoloxydasique du serum humain a été reconnue par de nombreux auteurs, et rattachée à la présence d'une cupro-protéine sérique, la céruloplasmine, isolée et purifiée par HOLMBERG et LAURRELL (18) (19) (20).

Ces deux auteurs isolèrent un alpha-séromucoïde, de poids moléculaire 151.000 et renfermant 8 atomes de cuivre par molécule, ce qui lui confère une couleur bleue.

Ils montrèrent d'autre part que les 9/10 du cuivre sérique sont combinés à cette protéine, tandis que 1/10 ne contracte que des liaisons lâches avec l'albumine.

Ils indiquèrent enfin deux de ses propriétés : une activité pseudo-laccasique parallèle à la teneur en cuivre et permettant l'oxydation de polyphénols et une activité histaminolutique (21).

Pour ces auteurs, la céruloplasmine est un véritable enzyme dont l'activité repose sur la liaison Cu-globuline. Le rôle de cette liaison est prouvée par l'expérience suivante : si on introduit du cuivre par voie intraveineuse il contracte des liaisons lâches avec l'albumine, mais il ne modifie en

rien l'activité polyphénoloxydasique du serum. Le cuivre albuminique n'aurait donc pas de pouvoir catalytique sur l'oxydation des polyphénols.

En 1949 SHACTER (22) étudia le pouvoir polyphénol oxydasique du serum par la méthode de Warburg, en prenant différents substrats. Il conclue à la présence d'une polyphénoloxydase spécifique des ortho-diphénols.

ORNYKIEWICZ et NIEBAUER (23) reprirent les expériences de Shacter et trouvèrent une grande activité du sérum vis-à-vis de la paraphénylène-diamine, le pyrogallol, tandis que la dopa l'adrénaline et l'hydroquinone sont très peu oxydés.

Le serum contiendrait donc une polyphénoloxydase spécifique des paradiphénols car ce pouvoir n'est pas inhibé par l'oxyde de carbone, comme le sont les ortho-diphénolases. Ces deux auteurs rapportent cette activité à la céruloplasmine et donnent comme argument l'augmentation parallèle du cuivre et du pouvoir polyphénoloxydasique au cours de la grossesse (24).

Ainsi la céruloplasmine serait un enzyme dont le cuivre est le centre actif et qui agirait à la fois sur les paradiamines, les paradiphénols. Elle confèrerait au serum un pouvoir oxydasique confirmé plus récemment par KOLB (25) et GRIMSONN (26) dans le serum de l'homme et de divers animaux.

Parallèlement à ces recherches, différents auteurs s'attachèrent surtout à étudier les variations pathologiques possibles de la céruloplasminémie et de la cuprémie et à détecter plus rapidement que par la méthode de Warburg l'activité polyphénoloxydasique du serum.

La variation pathologique la plus intéressante concerne la maladie de Wilson ou dégénérescence hépato-lenticulaire. Cette maladie qui associe cliniquement une dégénérescence des noyaux striés de la base et une atteinte hépatique, est caractérisée biologiquement par une rétention tissulaire du cuivre, une hypercuprémie et une hypercuprurie accompagnée d'une hyper amino-acidurie.

Or, malgré l'hypercuprémie, qui reste d'ailleurs modérée, l'activité polyphénoloxydasique du serum est très diminuée. Ce trouble ne peut s'expliquer que par une diminution parallèle de la céruloplasmine et le cuivre qui a franchi la barrière intestinale en plus grande quantité ne peut se fixer sur sa globuline spécifique. La diminution congénitale de la céruloplasmine expliquerait le caractère héréditaire familial de la maladie de Wilson (27).

On a pu démontrer par l'emploi de cuivre radioactif que le cuivre se fixe alors sur l'albumine.

Ceci est encore une confirmation du rôle peu important du cuivre lorsqu'il n'est pas lié à sa protéine, du moins dans les réactions oxydasiques. De plus cette maladie semble indiquer que la céruloplasmine joue un rôle identique à la sidérophylle en réglant l'absorption intestinale du cuivre.

Mis à part cette maladie rare les modifications du pouvoir polyphénoloxydasique du sérum sont moins bien connues, mais l'importance psychiatrique de la céruloplasmine est soulevée par plusieurs auteurs.

Citons les recherches de SCHEINBERG et GITLIN (28) et de APRISON et DREW sur des serums de schizophrènes, mais les résultats sont encore discutés.

Dans la recherche d'une incidence pathologique du pouvoir oxydasique du serum, la méthode manométrique de Warburg est abandonnée en faveur de techniques plus rapides. C'est ainsi que AKERFELDT (29), BEARN et KUNKEL et d'autres (30) (31) (32) (33) préfèrent des méthodes spectro-photométriques.

De ces différentes techniques il faut faire une place à part aux travaux de URIEL et de ses collaborateurs. Ceux-ci ont décrits récemment une technique de détection du cuivre lié aux protéines (34) et ils mirent au point une micro-méthode permettant de tester l'activité paraphénylènediamine-oxydasique après électrophorèse engélose, par enregistrement direct des produits colorés dérivés de la paraphénylènediamine (35).

Au terme de l'analyse de ces différents travaux relatifs à l'activité polyphénoloxydasique du serum plusieurs conclusions se font jour : nous retiendrons essentiellement que les paradiphénols et les paradiamines sont oxydés par le serum humain et que l'agent oxydant est la céruloplasmine.

La nature enzymatique de cette activité vient récemment de recevoir une nouvelle confirmation de MORELL et SCHEINBERG (36). Ces auteurs après avoir montré que la séparation du cuivre de la protéine enlève toute action et dénature la céruloplasmine, ont réussi à obtenir une séparation réversible du cuivre et de l'apoprotéine.

Si le cuivre joue un rôle important il est cependant fort probable que l'activité enzymatique n'en est pas directement fonction. Cet enzyme apparait assez particulier; on ne peut pas parler de spécificité de substrat ni même de groupe; si tous les paradiphénols sont oxydés, certains ortho le sont aussi, tel le pyrocatechol. Cette action est voisine de celle de la laccase qui oxyde préférentiellement les paraphénols mais aussi les ortho. Il faut encore remarquer que ces deux

enzymes ont pour substrat des corps très réducteurs et l'oxydation préférentielle des paraphénols est peut être due en partie à la plus grande oxydabilité de ces corps.

Système oxydant du plasma; la céruloplasmine présente encore des analogies d'action avec deux enzymes tissulaires, l'acide ascorbique oxydase et la cytochrome oxydase. Remarquons que cette dernière peut parfaitement oxyder la dopa comme l'a montré HESSELBACH (37).

Enfin, comme tous les cupro-enzymes, et en particulier comme la tyrosinase, la céruloplasmine est inhibée par le glutathion (38). AKERFELDT attribue encore un rôle inhibiteur aux groupes SH libres et combinés, à l'albumine et ABOOD et GIBBS (39) voient dans l'acide ascorbique un nouvel inhibiteur.

Après la publication de HOLMBERG et LAURELL (40) on a pu penser que la céruloplasmine intervenait dans les systèmes histaminolytiques. Cette hypothèse n'a pas reçu confirmation et PORTER (41) a indiqué récemment que si la sérotonine est oxydée par la céruloplasmine, c'est toutefois sans libération d'ammoniac. On ne peut donc pas parler d'activité diamineoxydasique en général puisque la diamineoxydase s'attaque à ses substrats en libérant de l'ammoniac et de l'eau oxygénée.

Malgré un nombre croissant de travaux relatifs à la céruloplasmine, cette cuproprotéine du serum reste bien mystérieuse. Conférant au serum un pouvoir polyphénoloxydasique, elle ne peut pas cependant être directement en cause dans l'oxydation de la tyrosine et de la dopa. Si cette dernière est légèrement oxydée, nous avons pu constater qu'elle l'est qu'en fonction du taux du cuivre de la céruloplasmine.

ROLE DU SERUM HUMAIN SUR L'AUTO-OXYDATION DE LA DOPA

Cette question a fait l'objet de nos premières recherches et vient d'être étudiée dans une publication récente de MONDER, WILLIAMS et WAISMAN (42) qui concluent à un pouvoir inhibiteur du serum. Ce pouvoir varie en fonction des doses de plasma ajoutées et persiste après dialyse. Pensant alors que le principe inhibiteur est d'origine protéique, ces auteurs étudient les fractions de Cohn qui se montrent différemment actives.

Cependant ce phénomène n'a pas reçu d'explication satisfaisante, mais deux théories sont rejetées par les auteurs :

- le rôle des groupes SH des protéines;
 - la fixation de traces de métaux sur les protéines, empêchant ceux-ci de catalyser l'oxydation de la dopa.
- Ils pensent plutôt à la fixation d'un intermédiaire de la dopa sur les protéines, cet intermédiaire étant un activateur de l'oxydation.

En fait, il est bien clair que nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'une solution parfaitement satisfaisante tenant compte des différents taux d'inhibition selon les fractions considérées et voire de l'inactivité de certaines d'entre elles.

Nous exposerons plus loin le résultat de nos recherches sur ce sujet.

ROLE DU SERUM HUMAIN SUR L'OXYDATION CATALYTIQUE DE LA DOPA

L'adjonction de serum à un mélange de dopa et de cuivre, augmente-t-elle l'oxydation de la dopa :

- Ce problème a été bien étudié par M. POLONOVSKI et P. GONNARD (43) et repris dernièrement par MONDER et

collaborateurs (44). Ces auteurs concluent à un pouvoir catalytique du serum et recherchent par l'emploi de différentes fractions les plus actives. En prenant une dose de cuivre donnant à la dopa une oxydation maximale (10^{-4}), l'addition de serum albumine et de globulines élèvent encore le taux d'oxydation. Le pouvoir catalytique est maximum avec les globulines, mais identique pour les différentes fractions globuliniques. Ceci semble bien montrer que la céruloplasmine ne joue pas, du moins dans ces conditions, un rôle particulier. Le pouvoir catalytique des protéines est expliqué par MONDER par le maintien du cuivre à l'état ionique à la surface de la protéine. Quand on opère in vitro à un pH supérieur à 7, le cuivre forme en partie, avec le tampon, de l'hydroxyde et du phosphate inactifs sur l'oxydation de la dopa.

Ainsi le rôle catalytique du serum sur l'oxydation cuprique de la dopa est bien connu, mais il est beaucoup plus difficile d'apporter une explication au pouvoir catalytique supérieur des globulines.

ROLE DU SERUM HUMAIN SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE LA DOPA ET DE LA TYROSINE

Le serum humain intervient-il sur l'oxydation tyrosinasique ?

-Nous nous sommes proposés de reprendre l'étude de cette question qui a fait l'objet de publications contradictoires. OWEN et MARKERT (45) étudièrent surtout la question sur le plan immunologique. Ils réussirent à obtenir un immum serum de lapin ayant un pouvoir antityrosinasique.

Cependant en étudiant l'effet de l'antiserum sur l'activité tyrosinasique ils furent obligés de considérer l'effet des constituants d'un serum normal.

Pour ces auteurs le serum normal de lapin contient trois principes :

- une petite molécule dialysable dont les effets inhibiteurs peuvent être attribués à des composés sylfhydryles connus,
- une portion non dialysable inhibitrice qui semble être une propriété constante du serum,
- un effet protecteur sur la stabilité de l'enzyme qui apparait au cours des expériences prolongées.

Mais notre travail a surtout été déterminé par les recherches de C. GRUPPER (46) qui s'attacha surtout à l'application clinique éventuelle d'une action anti-tyrosinase du serum. Ce dernier dans le laboratoire de FITZPATRICK mit en évidence un pouvoir inhibiteur du serum normal vis-à-vis de l'oxydation de la tyrosine par de la tyrosinase de mélanome de cheval. L'intérêt de ce travail a encore été accru par le fait que ce pouvoir inhibiteur est augmenté dans le serum de malades porteurs de mélanomes.

Dans le même temps SLOTTA, BRILL et FRANKENTHAL mirent en évidence ce principe inhibiteur dans le serum et le liquide vésiculaire.

A l'opposé il faut citer les expériences contradictoires de SIZER et KRUGELIS (48) qui nient tout pouvoir inhibiteur du serum normal. Ces auteurs étudièrent surtout les relations existant entre la tyrosinase et le système de la coagulation. Ils constatèrent in vitro l'action inhibante de la tyrosinase sur le système prothrombine-thrombine. In vivo cette action est inhibée elle même par les fractions IV et III. Ils pensent que ces fractions entrent en compétition avec la tyrosinase.

D'autre part ils recherchent si le serum avait une activité anti-tyrosinasiq^{ue} en étudiant les fractions suivantes :

- tyrosinase+tyrosine+serum+fraction IV
- tyrosinase+tyrosine+fraction IV

Le taux de transformation est légèrement supérieur avec le sérum et n'apporte donc que des éléments contre tout pouvoir anti-tyrosinasiq^{ue} du serum. Ils expliquent même le taux supérieur par la présence dans le serum de subtrats de la tyrosinase.

Nous avons voulu dans ce travail reprendre ce problème objectivement en étudiant une série de serums normaux et pathologiques. Nous tenons ici à remercier notre maitre C. GRUPPER pour ses suggestions, ses encouragements amicaux et pour avoir si obligeamment mis à notre disposition les serums pathologiques dont nous avions besoin.

Notre travail a porté ainsi sur 46 serums normaux et 17 serums pathologiques. Dans une première partie nous allons donner les techniques que nous avons employées. Dans la deuxième partie nous exposerons nos résultats.

2ème PARTIE

CHAPITRE I

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

MESURE DE L'OXYDATION -

Les expériences ont été effectuées selon la technique manométrique de Warburg à pH 7 en présence de tampon phosphate M/15.

SUBSTRATS et ENZYMES -

Nous avons utilisé la L tyrosine et la D-L dopa en solution aqueuse à 0,4%.

La préparation enzymatique est obtenue par expression du suber de pomme de terre, double précipitation par le sulfate d'ammonium, précipitation acétonique et reprise du précipité dans de l'eau selon la technique indiquée par KUBOWITZ (49). La solution aqueuse est lyophilisée après dialyse. Elle conserve son activité plusieurs mois.

Nous avons surtout utilisé la tyrosinase de mélanome de cheval mise à notre disposition par C. Grupper. Si l'activité de cet enzyme s'est révélée très satisfaisante, sa solubilisation par contre n'a été obtenue qu'en mettant l'enzyme dans une solution de tampon phosphate et en portant une demi heure à l'étude à 25°.

FLACONS DE WARBURG -

Dans l'espace central de chaque fiole de Warburg on mesure 0,5 ml de serum dilué au 1/5 avec le tampon.

Dans un appendice latéral, 0,4 ml de solution de dopa (1600 gamma) ou de tyrosine-dopa (1600 gamma, 40 g de dopa).

Dans l'autre appendice latéral, 0,3 ml de préparation enzymatique, correspondant à 70 gamma d'azote.

Dans le godet central, 0,2 ml de potasse à 20%. Après équilibre des températures, en atmosphère d'oxygène, on verse le contenu des appendices latéraux dans l'espace principal et on effectue les mesures toutes les 10 minutes.

PRELEVEMENT DU SERUM -

Aussitôt après le prélèvement, le serum doit être placé au réfrigérateur et les expériences doivent être effectuées moins de 12 heures après.

Le sang ne doit pas présenter la moindre hémolyse qui se traduit par une consommation d'oxygène dans les témoins sans substrats.

Il n'est pas possible d'ajouter le serum de pénicilline pour une conservation éventuelle car celle-ci provoque une légère augmentation de l'oxydation de la dopa.

Le sérum prélevé dans ces conditions est dilué au 1/5 et dans certaines expériences est dialysé contre de l'eau. Sa dilution est ensuite ajustée au 1/5.

De même après défécation à l'acide trichloracétique, sa dilution est elle ajustée et son pH remis à 7.

DOSAGE DE LA DOPA -

Nous avons dans certaines expériences dosé la dopa restante après oxydation.

Le dosage colorimétrique de la dopa est fondé sur la réaction d'ARNOW (50) : la dihydroxyphénylalanine donne en présence du réactif nitro-molybdique en milieu alcalin une coloration rose à rouge groseille. Les ions hydrogènes des groupes phénoliques s'unissent aux ions nitrites du nitrite de sodium et l'acide nitreux qui en résulte forme des composés NO avec les phénols. Le molybdate prévient de la décomposition trop rapide de l'acide nitreux.

REACTIFS -

- ClH 0,6 N
- réactif nitro-molybdique : nitrite de soude 5 g
molybdate de soude 5 g
eau distillée 50 ml
- Soude N
- Eau bidistillée

TECHNIQUE -

A 0,4 ml de la solution de dopa on ajoute dans l'ordre les réactifs suivants :

- ClH..... 0,5 ml
- réactif I ml
- Soude I ml
- eau I ml

La lecture de la coloration se fait sur le photomètre Jean et Constant à 5000 Å.

Il faut noter que ces réactifs doivent être ajoutés dans l'ordre et en particulier que l'addition de soude doit être faite immédiatement après adjonction du réactif nitro-molybdique. Ces conditions sont nécessaires à une coloration stable.

Ce dosage a été adapté au dosage de la dopa au cours des expériences effectuées selon la technique de Warburg après précipitation des mélanines formées par l'acide trichloracétique à 20%. Ce dernier, en effet, apporte un excédent d'acidité qui rend la coloration instable. Pour pallier à cet inconvénient nous avons ajouté 0,5 ml de soude avant d'employer la technique ci-dessus décrite. Nous avons vérifié par de nombreux témoins que cette addition n'influence pas la coloration et que la quantité de soude peut même varier légèrement sans inconvénient.

SOLUTION STANDARD -

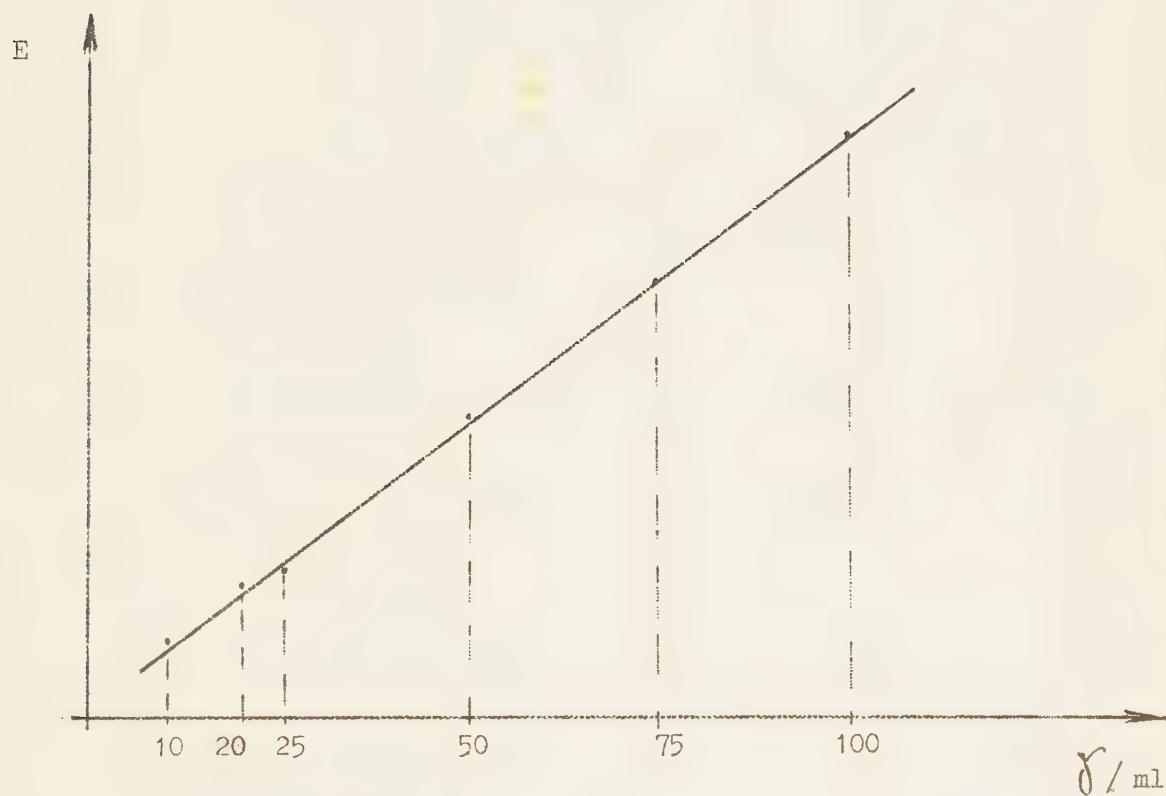
Elle est préparée à partir de 50 mg de D-L dopa dissoute dans 250 ml d'eau. On ajoute 1 ml de ClH 0,1 N et on complète à 500 ml.

Nous avons encore préparé une deuxième solution en tenant compte de l'acide trichloracétique, de la soude et du tampon employée au cours de l'étude de l'oxydation de la dopa.

10 mg de dopa sont dissouts dans 5 ml d'eau. On ajoute 4 ml de tampon phosphate M/15 pH 7, 4 ml d'eau, 2ml de soude et on complète à 20 ml.

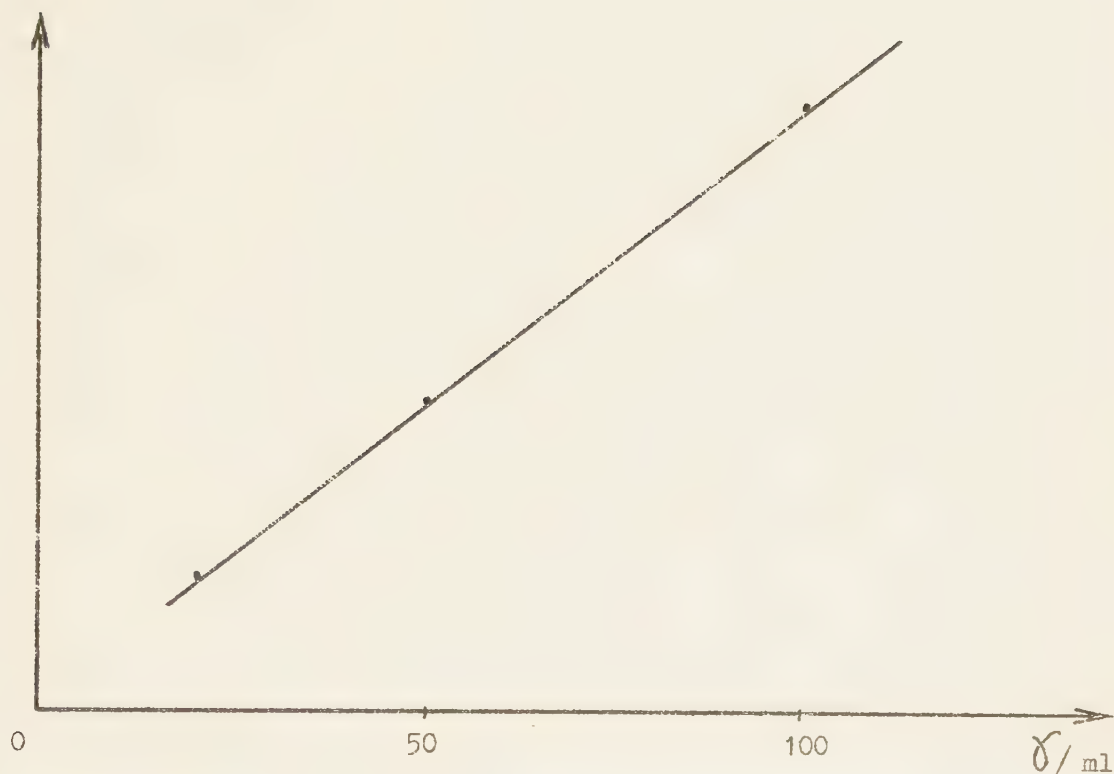
Les courbes d'étalonnage obtenues après dilutions sont rigoureusement identiques :

COURBE N° I



A = 78	D = 19
B = 58,5	E = 17
C = 40,5	F = 10

COURBE N° 2



A' = 80 C' = 41 E' = 17,5

APPLICATION -

1 - Flacons de Warburg ne contenant pas de serum -

Le contenu total de chaque fiole est déféqué par 0,5 ml d'acide trichloracétique à 20%. Les mélanines précipitent et sont éliminées par centrifugation. Le liquide surnageant est dilué au 1/5 et additionné de 0,5 ml de soude N.

La réaction d'Arnow est alors effectuée sur 0,4 ml de cette solution.

2 - Flacons de Warburg contenant du serum -

La centrifugation après défécation doit être prolongée; l'addition de soude est facultative.

3 - Préparation des témoins -

Dans les deux cas on fera un témoin comprenant :

- eau 0,4 ml - tampon 1 ml
- acide trichloracétique 0,5 ml
- Soude 0,5 ml

auquel on ajoute ensuite les réactifs d'Arno_w.

DOSAGE DE LA TYROSINE -

Nous n'avons malheureusement pas pu exécuter les dosages de la tyrosine restante après oxydation et notre seul test d'activité a donc été la consommation d'oxygène sous l'action de la tyrosinase. Nous avons essayé d'appliquer le dosage de la tyrosine donné par OTTAWAY (51) mais nous n'avons pas pu le continuer : ce dosage est basé sur la coloration de la tyrosine en présence du réactif au nitrosonaphtol en milieu nitrique concentré et nous n'avons pas pu obtenir une stabilisation de la coloration. Nous avons de plus remarqué une variation nette de la coloration en fonction des gouttes d'acide nitrique ajouté. De plus, dans nos conditions d'expérience l'acide trichloracétique modifie la coloration.

2ème PARTIE

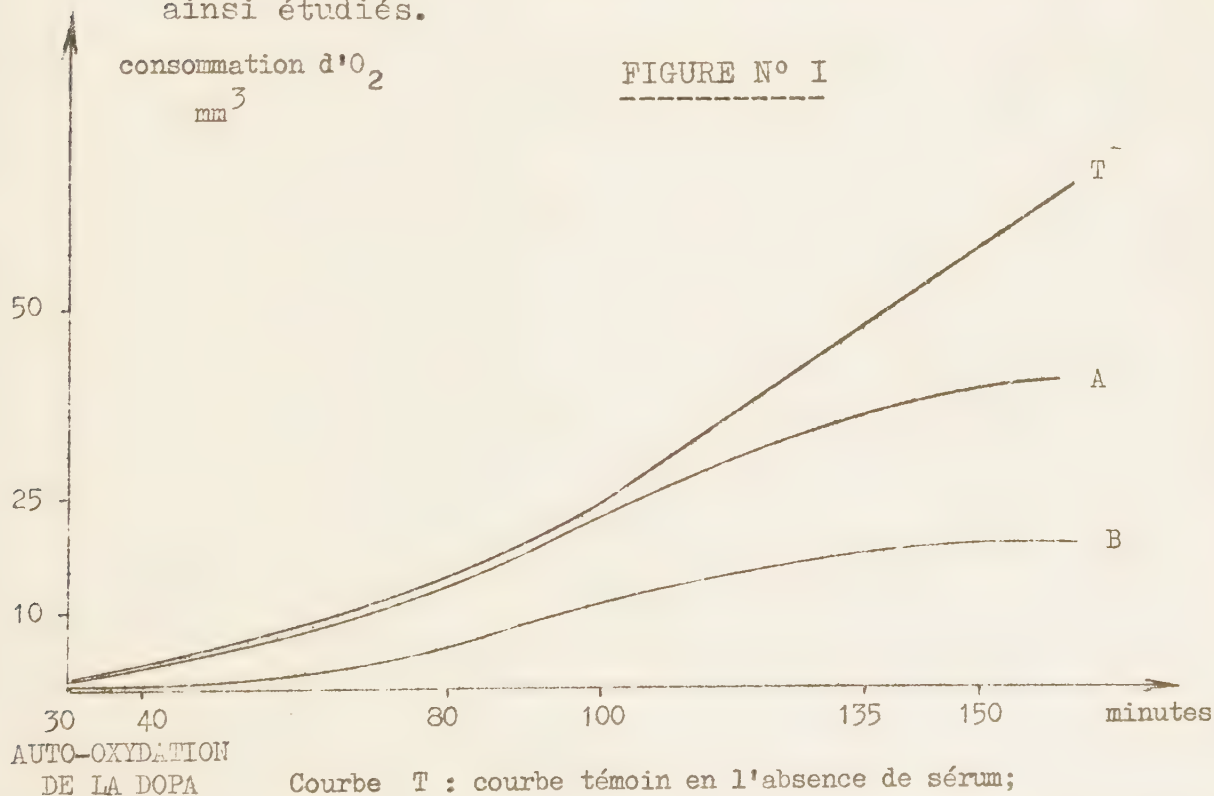
CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION CONCERNANT LES SERUMS NORMAUX

ACTION DU SERUM HUMAIN SUR L'AUTO-OXYDATION DE LA DOPA

Nous avons dans un premier temps établi une courbe de référence représentant la consommation d'oxygène en fonction du temps, d'une solution de dopa en tampon pH 7.

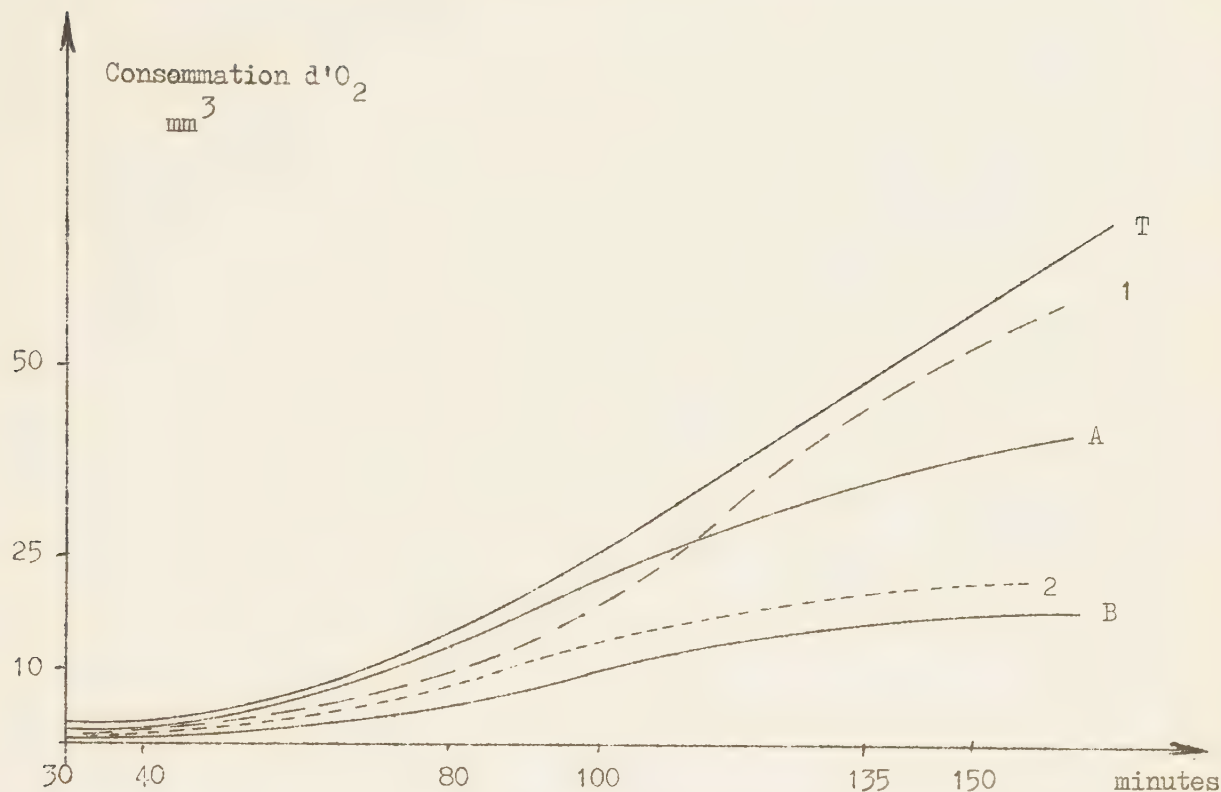
Puis nous avons recherché les modifications apportées par l'adjonction de serum 17 sérums normaux ont été ainsi étudiés.



Courbe T : courbe témoin en l'absence de sérum;

Courbes A et B : courbes limites entre lesquelles se répartissent les cinétiques en présence de sérums.

FIGURE N° 2



AUTO-OXYDATION DE LA DOPA

Courbes T, A et B de la figure n° 1

Courbe 1 : oxydation en présence de sérum déprotéinisé;

Courbe 2 : oxydation en présence de sérum dialysé.

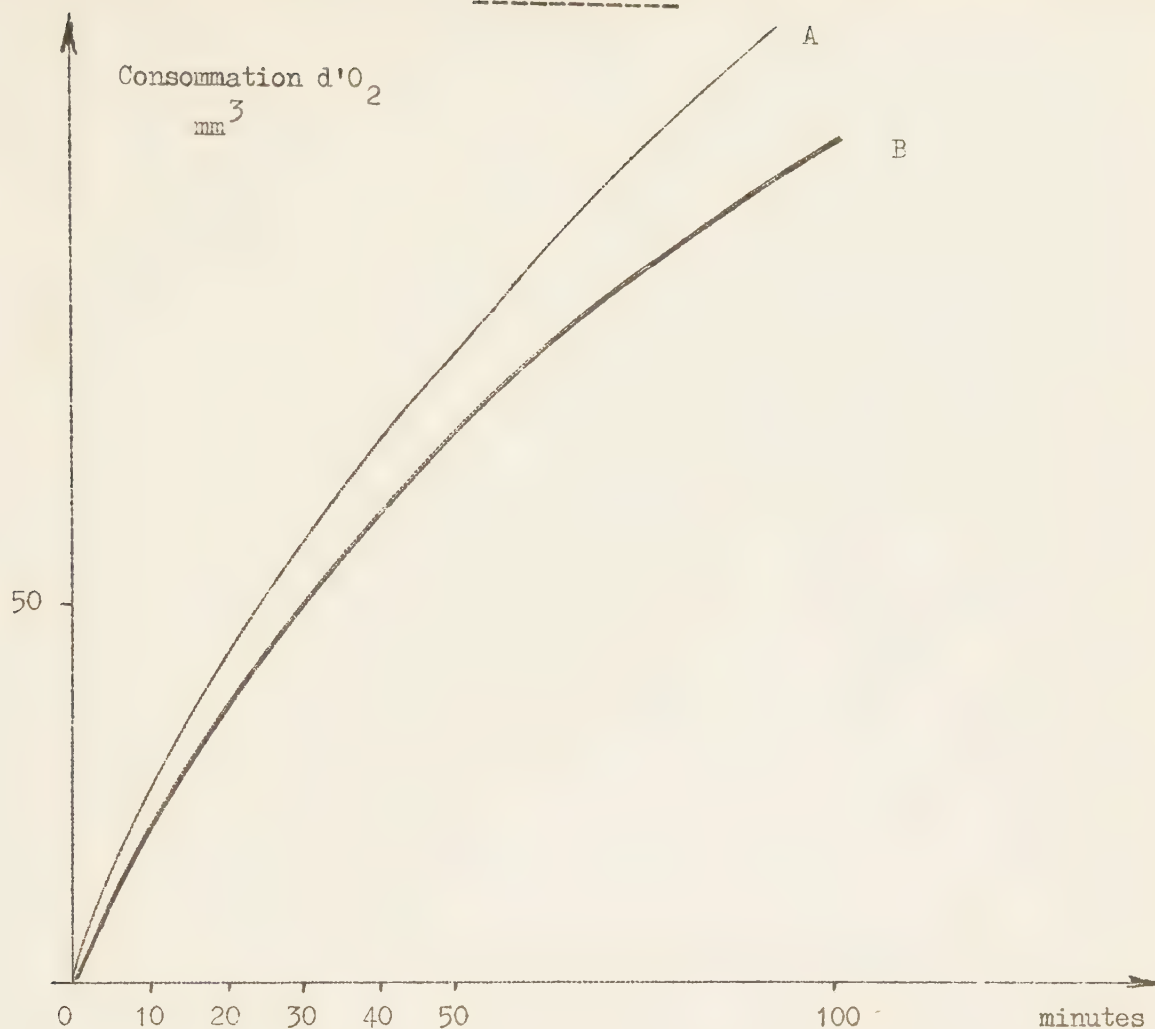
ACTION DU SERUM HUMAIN SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE LA DOPA

Nous avons étudié deux préparations enzymatiques et établi pour chacune une courbe de référence correspondant à l'oxydation enzymatique de la dopa en l'absence de sérum.

Nous avons recherché ensuite sur 46 sérums normaux le rôle du sérum ajouté au milieu.

Nos résultats sont consignés dans les figures 3, 4, 5 et le tableau 2.

FIGURE N° 3



Courbe A : oxydation enzymatique de la DOPA en présence de tyrosinase animale;

Courbe B : oxydation enzymatique de la DOPA en présence de tyrosinase végétale.

TABLEAU N° 2

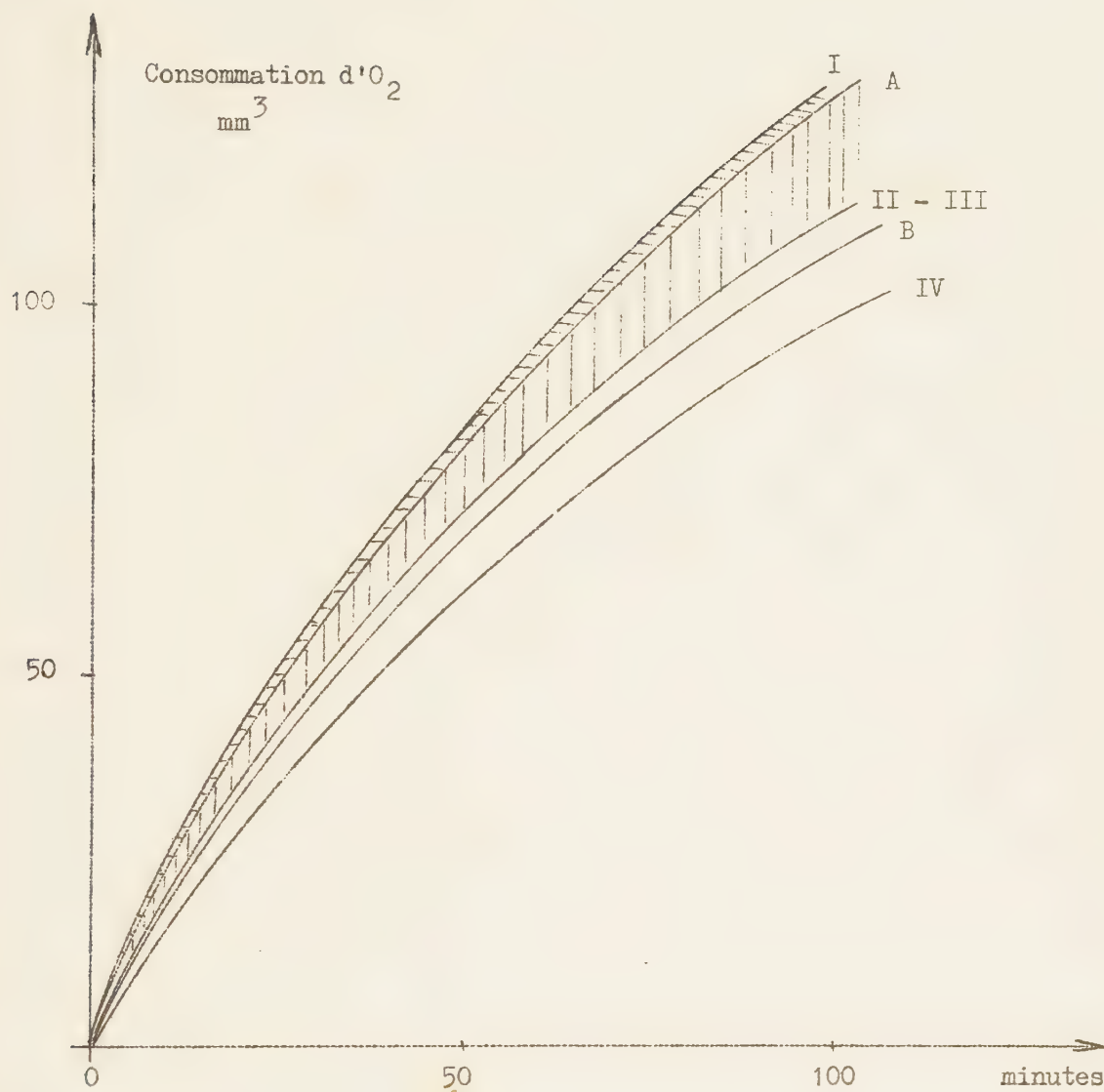
Dosage de la dopa restante à la 120^e minute :

- courbe I de la figure 4 : 49%
- courbe II : 23%

Activité pour cent par rapport au témoin :

- 85-88% 4 serums.
- 88-92% 10 serums
- 92-95% 14 serums
- 95-98% 7 serums
- 98-100% 7 serums
- 100-102% 4 serums

FIGURES N° 4 et 5



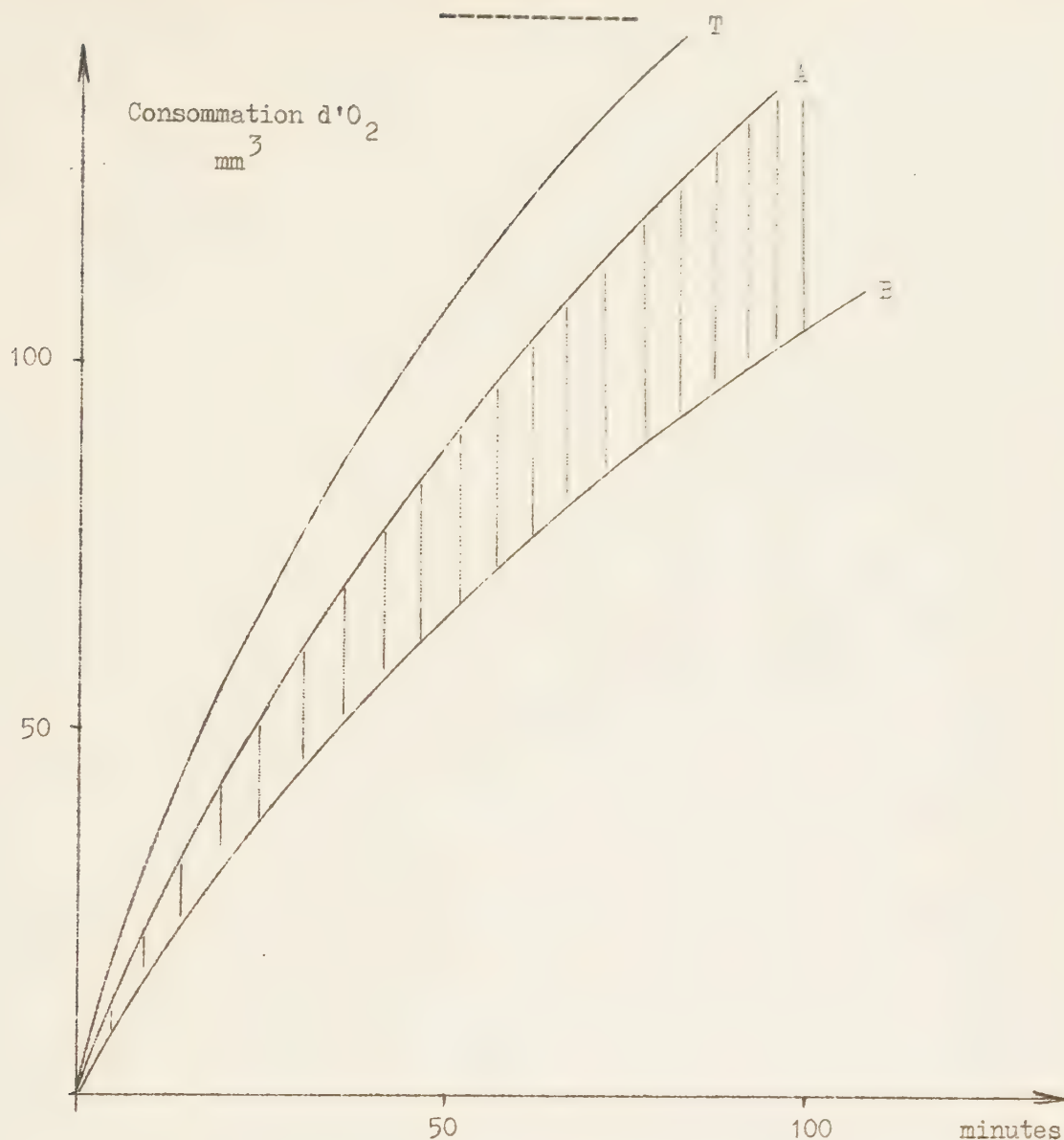
Courbe A : oxydation enzymatique de la DOPA en présence de tyrosinase animale;

Courbes I et II : courbes limites entre lesquelles se répartissent les cinétiques en présence de sérums;

Courbe B : oxydation enzymatique de la DOPA en présence de tyrosinase végétale

Courbes III et IV : courbes limites entre lesquelles se répartissent les cinétiques en présence de sérums;

FIGURE N° 6



Courbe T : oxydation enzymatique de la tyrosine en présence de tyrosinase animale, en l'absence de sérum;

Courbes A et B : courbes limites entre lesquelles se répartissent les cinétiques en présence de sérums.

TABEAU N° 3

Activité pour cent par rapport au témoin :

- 60%	1 serum
- 60 à 65%	3 serums
- 65 à 70%	15 serums
- 70 à 75%	4 serums
- 75 à 83%	3 serums

TABIEAU N° I

Consommation d'oxygène des 17 serums, à la 30è, 60è, 120è
et 150è minute

SERUMS	30m	60m	120m	150m
I	3,5	4,5	25	34
2	2	4,5	25,5	35,5
3	2	3	22	33
4	2	3,5	24	34
5	2	3,5	24	32
6	3	4	23,5	37,5
7	3,5	4	23,5	37
8	3,5	6,5	24,5	37
9	3	4	22	34
10	3,5	6,5	25	37,5
11	2	3	22	34
12	2,5	6	25,5	37
13	3,5	7	26	38
14	3,5	7	25,5	37
15	2	4	22	32
16	2	4,5	23	34
17	3	5	23,5	35

Sur l'auto-oxydation de la dopa nous avons encore recherché
quel pouvait être l'action d'un serum déprotéinisé et d'un
serum dialysé.

DISCUSSION

A - AUTO-OXYDATION DE LA DOPA-

Le serum humain a une action inhibitrice constante sur l'auto-oxydation de la dopa, comme le prouve l'action de 17 serums différents étudiés.

La nature protéique de l'inhibiteur prouvé par MONDER a été retrouvée dans notre travail.

B - OXYDATION ENZYMATIQUE DE LA DOPA ET DE LA TYROSINE -

Les 46 serums étudiés sur l'oxydation enzymatique de la dopa et les 26 serums étudiés sur l'oxydation de la tyrosine montrent un effet généralement inhibiteur. Ce pouvoir se manifeste, dans chaque flacon de Warburg, pour 0,5 ml de serums dilué au 1/5.

Avec la dopa, ce pouvoir inhibiteur du serum est néanmoins modéré et il n'a pas été obtenu avec 4 serums. On peut cependant se demander si l'accroissement de la consommation d'oxygène pour ces quatre serums n'est pas dû à un début de culture ou à la présence d'hématies qui, insistons le, représente la cause d'erreur la plus importante du fait de leur respiration.

L'inhibition étudiée avec la tyrosine comme substrat est nettement plus accentuée. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'action du serum.

Il semble que l'on puisse, du moins dans nos conditions d'expérience, éliminer le rôle des sels minéraux, puisque la dialyse ne modifie que très peu l'action du serum.

Par contre la présence de groupements thiols libres à la surface des protéines pourrait expliquer l'inhibition partielle de la tyrosinase. Il pourrait aussi s'agir d'une inhibition compétitive avec la tyrosine incluse dans les molécules protéiques. L'explication proposée par MONDER dans le cas de l'auto-oxydation de la dopa pourrait s'appliquer ici : la dopaquinone ou un autre précurseur des mélanines agirait comme un accélérateur de l'oxydation, et sa fixation par les protéines entraînerait son inactivation.

Devant ces divers modes d'oxydation de la tyrosine et de la dopa le comportement du serum montre à quel point il représente un milieu complexe. Permettant par ses protéines la catalyse de l'oxydation cuprique de la dopa; vraisemblablement par fixation du cuivre ionique sur les protéines mais par contre, inhibant par ses mêmes protéines l'auto-oxydation de la dopa et l'oxydation enzymatique de la tyrosine et de la dopa.

La céruloplasmine ne semble pas intervenir et si elle peut, comme nous l'avons vérifié, oxyder la dopa en fonction de sa teneur en cuivre, elle est incapable d'oxyder la tyrosine et ne peut donc pas être considérée comme une tyrosinase sérique.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION CONCERNANT LES SERUMS PATHOLOGIQUES

ACTIONS DE SERUMS PATHOLOGIQUES SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE LA TYROSINE ET DE LA DOPA.

Nous avons, avec l'aide de notre maitre C. GRUPPER, sélectionné 10 serums de malades porteurs de mélanomes ou de métastases de mélanomes anciens traités chirurgicalement ou par la radiothérapie.

Sur tous les serums, nous avons étudié leurs actions vis-à-vis du système TYROSINE - TYROSINASE ANIMALE.

Avec certains d'entre eux, nous avons de plus recherché :

- l'action de serums dialysés;
- l'action de serums déprotéinisés;
- l'action de serums sur les systèmes DOPA---TYROSINASE
ANIMALE.
et TYROSINE---TYROSINASE VEGETALE.
- l'action de serums vieilliss;

- la variation du pouvoir inhibiteur en fonction de la dilution du serum;
- l'action de tels serums sur l'auto-oxydation de la dopa.

Nous reportons ci-dessous nos résultats précédés dans la mesure du possible d'un bref rappel de l'histoire clinique. Dans trois cas les serums nous ont été apportés d'hôpitaux différents et nous n'avons pu obtenir une observation complète.

Melle S. Yolande - 34 ans

- Développement en juillet 1956, sur un noevus pigmentaire siégeant sur le pubis d'un bourgeon prurigineux, extensif rouge, saignant au contact.
- - Apparition en décembre 1956 d'une adénopathie inguinale droite qui se met à suppurer en janvier 1957.
- Adénopathies inguinales extensives.
- Atteinte extrême de l'état général.
- Décédée en juillet 1957.

Le serum de cette malade a été prélevé en Avril 1957. Nous avons effectué 3 types d'expériences :

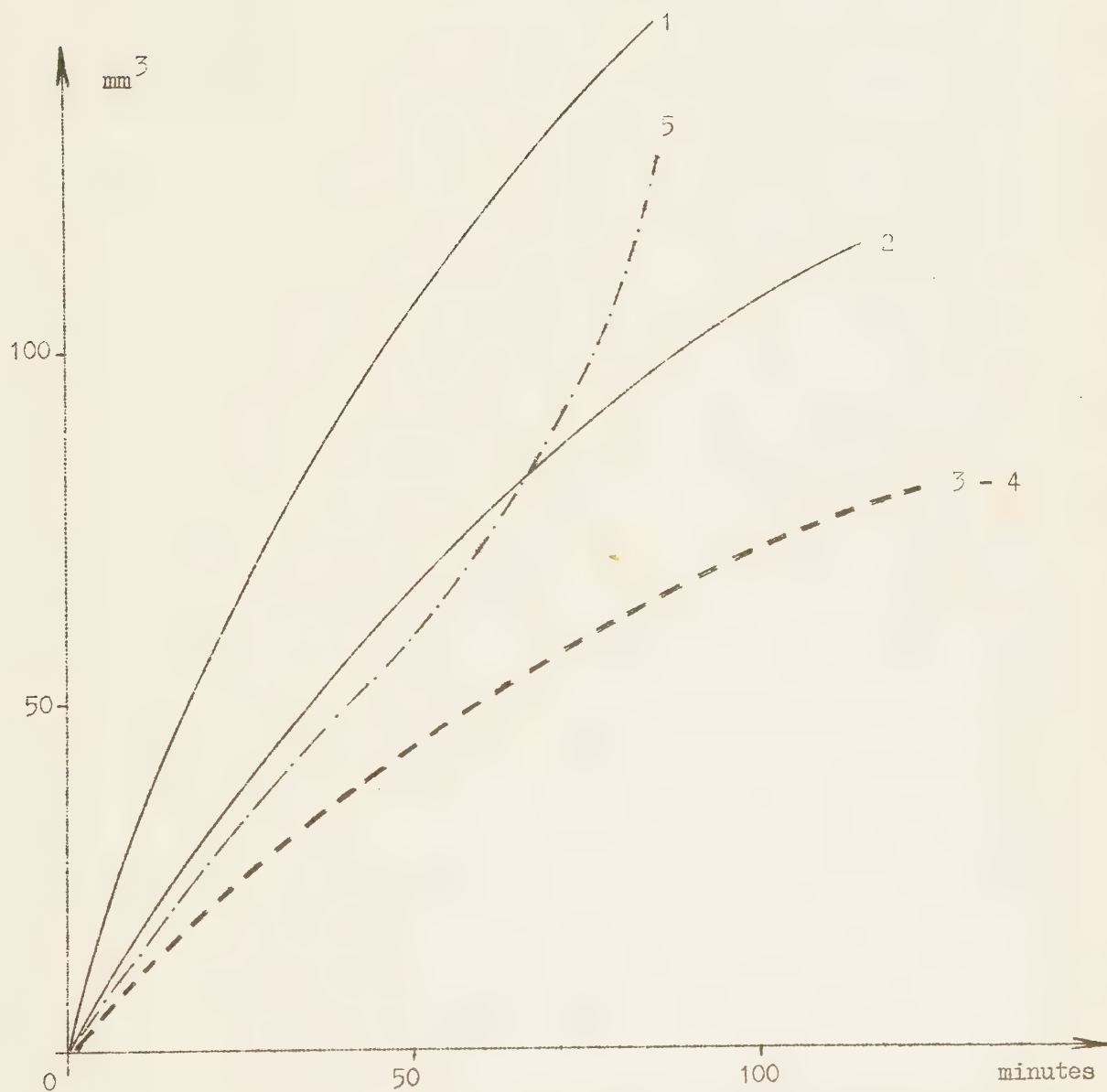
- oxydation de la tyrosine en présence de serum pathologique et de tyrosinase animale.
- action sur le même système du serum dialysé.
- action sur le même système du serum déprotéinisé.

Rappelons que tous les expériences sont faites avec 0,5 ml de serum dilué au 1/5.

Les résultats sont consignés dans la figure I.

Par rapport aux sérums normaux, l'augmentation de l'inhibition est ici de 35% au bout de 1 heure 1/2, soit une diminution globale de l'oxydation de la tyrosine de 43% dans le même temps.

FIGURE N° I



Courbe 1 : oxydation enzymatique de la tyrosine en présence de tyrosinase animale;

Courbe 2 : oxydation enzymatique en présence de sérums normaux ; limite inférieure;

Courbe 3 : cinétique en présence de sérums pathologiques;

Courbe 4 : avec le même sérum dialysé;

Courbe 5 : avec le même sérum déprotéinisé.

Monsieur B. - 51 ans

- Vient consulter en Janvier 1957 pour une lésion polychrome de la région sus-épineuse droite, ayant l'aspect de verrue seborrheique, mais érodée.
- Cette lésion est en évolution depuis 1955 et s'est développée à partir d'une plaque pigmentaire congénitale.
- Excision-greffe. L'Histologie confirme le diagnostic de noeovocarcinome.
- Le 6 Mai 1957, curage ganglionnaire pour adénopathie axillaire droite. L'Histologie des ganglions confirme le diagnostic de métastase.
- En Novembre 1957 : apparition d'une hépatomégalie rapidement extensive.
- Décédé fin 1957.

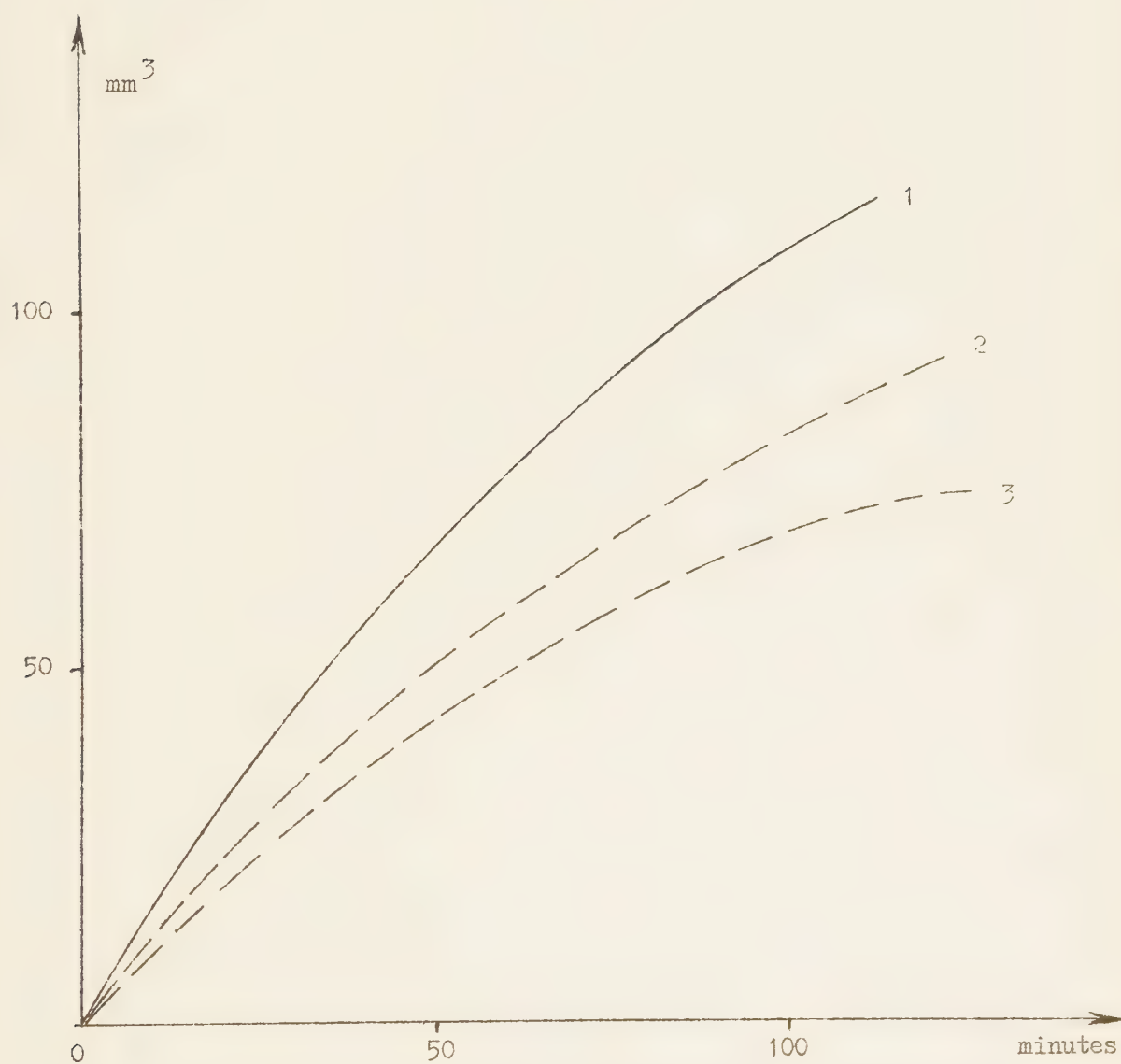
Nous avons prélevé du serum à 2 reprises, à 3 mois d'intervalle,

- Juillet 1957, 3 semaines après le Curage.
- Novembre 1957, au moment où est apparue l'hépatomegalie.

Les résultats sont consignés dans la figure 2 :

Le pouvoir anti-tyrosinasique du serum augmente au cours de l'évolution.

FIGURE N° 2



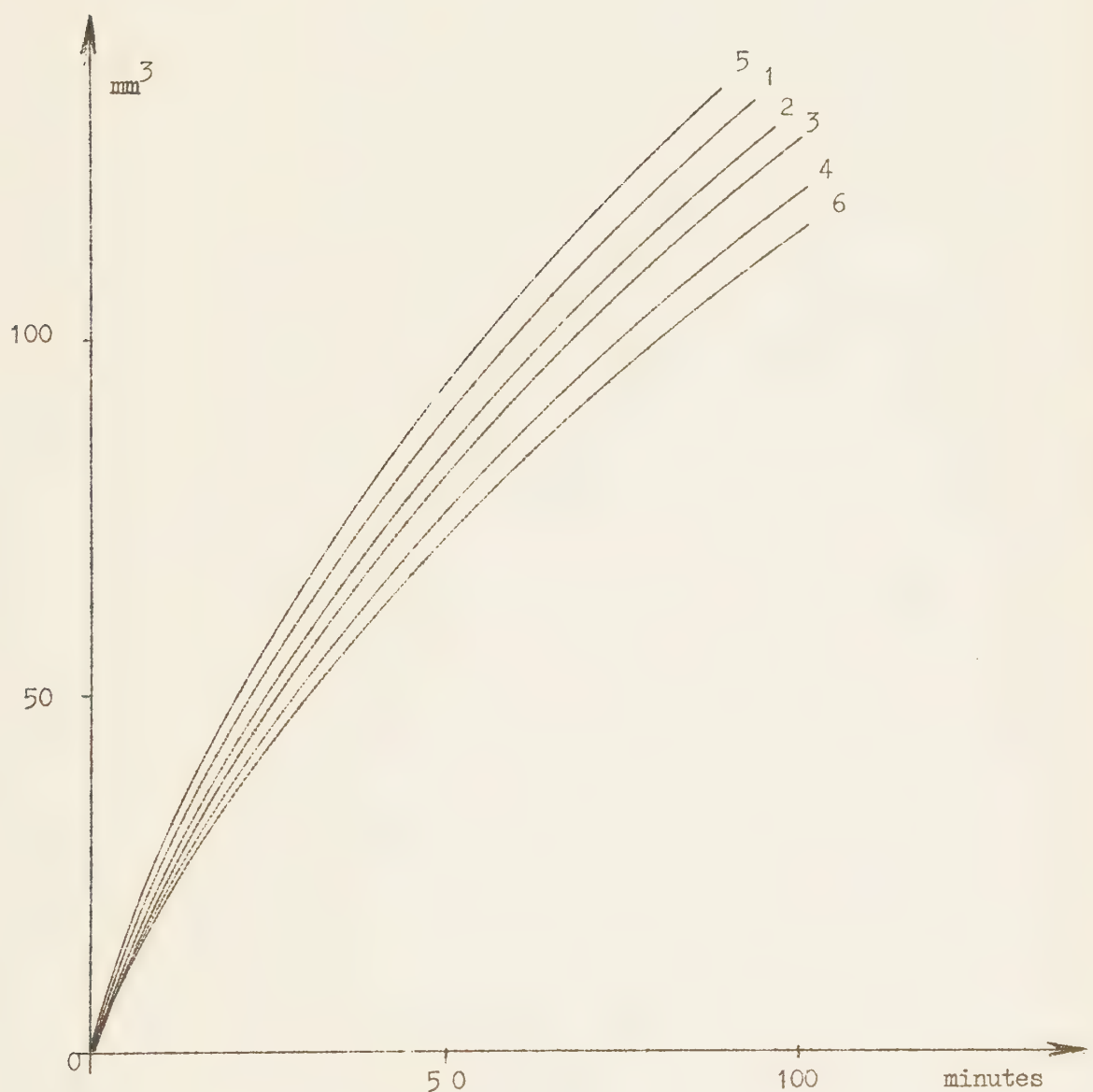
Courbe 1 : limite inférieure d'oxydation de la tyrosine en présence de tyrosinase animale et de sérums humains normaux;

Courbe 2 : cinétique en présence de sérum pathologique;

Courbe 3 : même sérum mais prélevé trois mois plus tard.

Nous avons de plus étudié ce serum en présence de tyrosinase végétale et de dopa. (Résultats Figure 3).

FIGURE N° 3



- Courbe 1 : tyrosine + tyrosinase végétale ;
- Courbe 2 : dopa + tyrosinase végétale ;
- Courbe 3 : tyrosine + tyrosinase végétale + sérum normal
- Courbe 4 : dopa + tyrosinase végétale + sérum normal
- Courbe 5 : tyrosine + tyrosinase végétale + sérum **pathologique**
- Courbe 6 : dopa + tyrosinase végétale + sérum **pathologique**

Monsieur G. Charles - 71 ans.

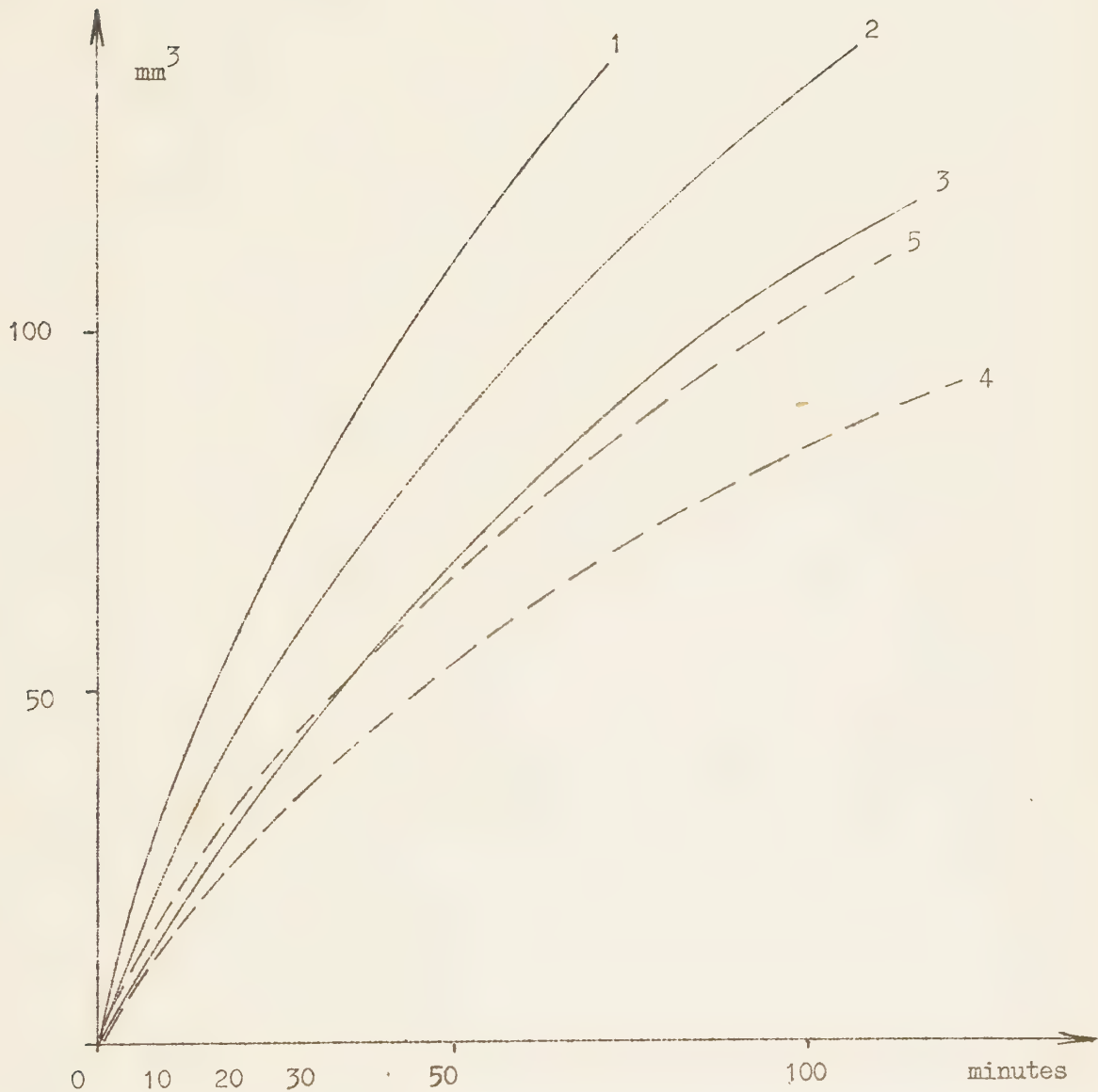
- 1951 : Extension lente d'un noevus de la région sous commissurale gauche, près du menton.
- 1953 : Electro-coagulation.
- Juin 1957 : Réapparition d'un grain pigmentaire peu à peu saillant, formant bientôt une tumeur ardoisée grosse comme une prune. L'infiltration déborde largement la lésion pigmentaire.
Serum prélevé avant l'intervention (31 Juillet 1957)
L'Histologie est évidente.
- Juin 1958 : malade revu - cyto-diagnostic envisagé.
Depuis le malade n'est pas revenu consulter.

Le serum de Monsieur G. donne une inhibition nette de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase animale.

En partant de la Dopa comme substrat, les résultats sont moins concluants.

(Figure 4).

FIGURE N° 4



Courbe 1 : oxydation enzymatique de la tyrosine en présence de tyrosinase animale ;

Courbe 2 : oxydation enzymatique de la dopa en présence de tyrosinase animale

Courbe 3 : limite inférieure d'oxydation de la tyrosine en présence de sérums normaux

Courbe 4 : cinétique en présence de tyrosine et de sérum pathologique

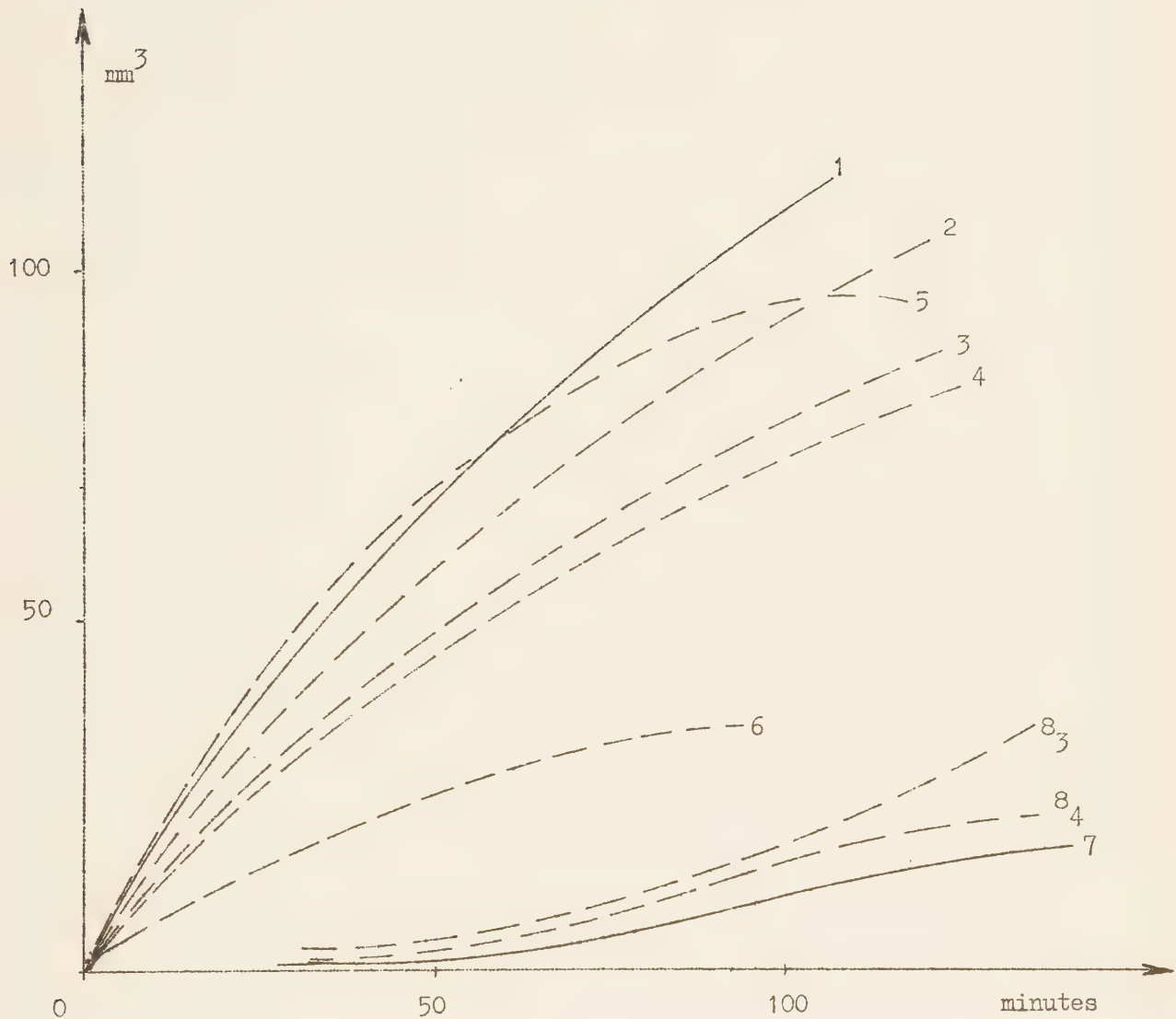
Courbe 5 : cinétique en présence de dopa et de sérum pathologique.

Monsieur G. Montéro - 36 ans

- Développement sur un noevus ancien, en Décembre 1955, dans la région interscapulo-vertébrale droite, d'une tumeur extensive, pigmentaire.
- Opéré en Décembre 1955 - Histologie : mélanome.
- Revu en Octobre 1957 avec adénopathie cervicale gauche.
- Serum prélevé en Avril 1958. (Courbe 2, figure 5).
- Radiothérapie pendant 2 mois.
- Nouveau prélèvement (Courbe 5, figure 5)
- Juin 1958 : Extension du noevo carcinome au membre supérieur droit.
- 3ème prélèvement - (Courbe 4, figure 5).
- Décédé fin Juin 1958.

Dans ce cas encore, nous voyons, au cours de l'évolution, augmenter le pouvoir anti-tyrosinase du serum. Nous avons, de plus, étudié ce serum sur l'auto-oxydation de la Dopa, mais là les résultats sont comparables à ceux obtenus avec les serums normaux. (Courbe 8₄, figure 5).

FIGURE N° 5



Courbe 1 : limite inférieure d'oxydation en présence de tyrosine et de tyrosinase animale ;

Courbes 2, 3, 4, 5, 6 : sérums pathologiques ;

Courbe 7 : auto-oxydation de la dopa + sérum ; limite inférieure ;

Courbe 8 : auto-oxydation de la dopa + sérum pathologique n° 3 - 4.

Monsieur C.L. - 57 ans (Hôpital COCHIN)

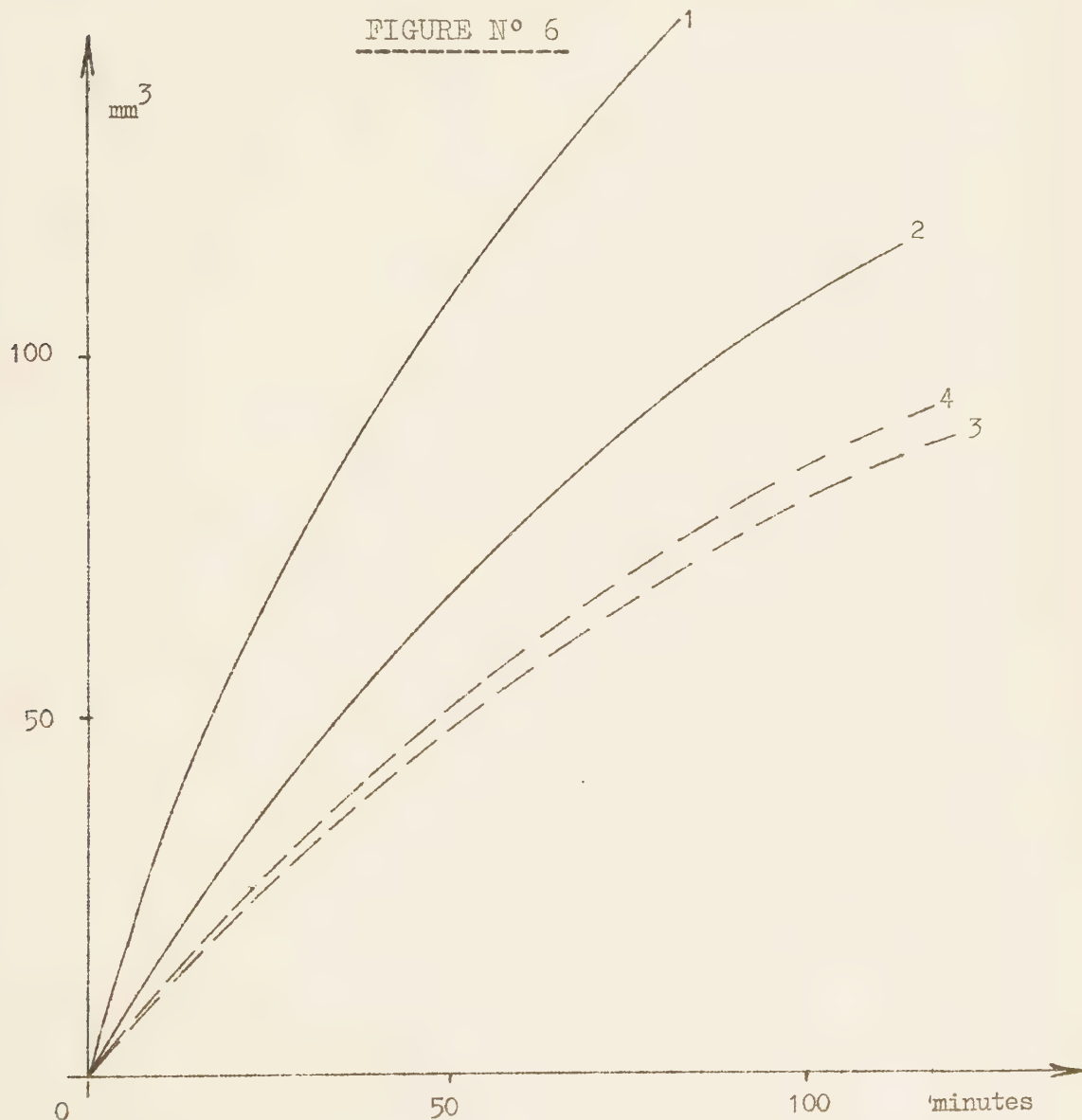
- Mélanome du Membre supérieur
- Métastases hépatiques.

Les résultats sont ici particulièrement intéressants, car l'oxydation de la tyrosine a presque été totale.

Ce pouvoir inhibiteur important s'accompagnait d'autre part d'une mélanurie massive.

- Décédé en Juillet 1958.

Les résultats sont consignés dans la Figure 5, Courbe 6.



Courbe 1 : oxydation enzymatique de la tyrosine en présence de tyrosinase animale ;

Courbe 2 : limite inférieure d'oxydation du système, en présence de sérums normaux ;

Courbe 3 : cinétique en présence de sérum pathologique ;

Monsieur M. Lucien

- Mélanome du membre inférieur gauche, récidivant in situ le long du trajet d'incision.
- I956 - Récidive sur les bords de la greffe.
 - Série de radiothérapie.
 - Métastases ganglionnaires : plusieurs nodules sus-claviculaires sont enlevés.
- I957 - Cobaltothérapie sur l'aine et la cuisse.
 - Atteinte de l'état général. Serum prélevé avant la cobaltothérapie.
- I958 - Amputation haute de la cuisse.
 - Quelques mois après efloraison brutale de nodules sur la cicatrice et l'hypocondre.
- Mort. Résultats consignés sur la Figure n° 6, courbe 4 et 3.

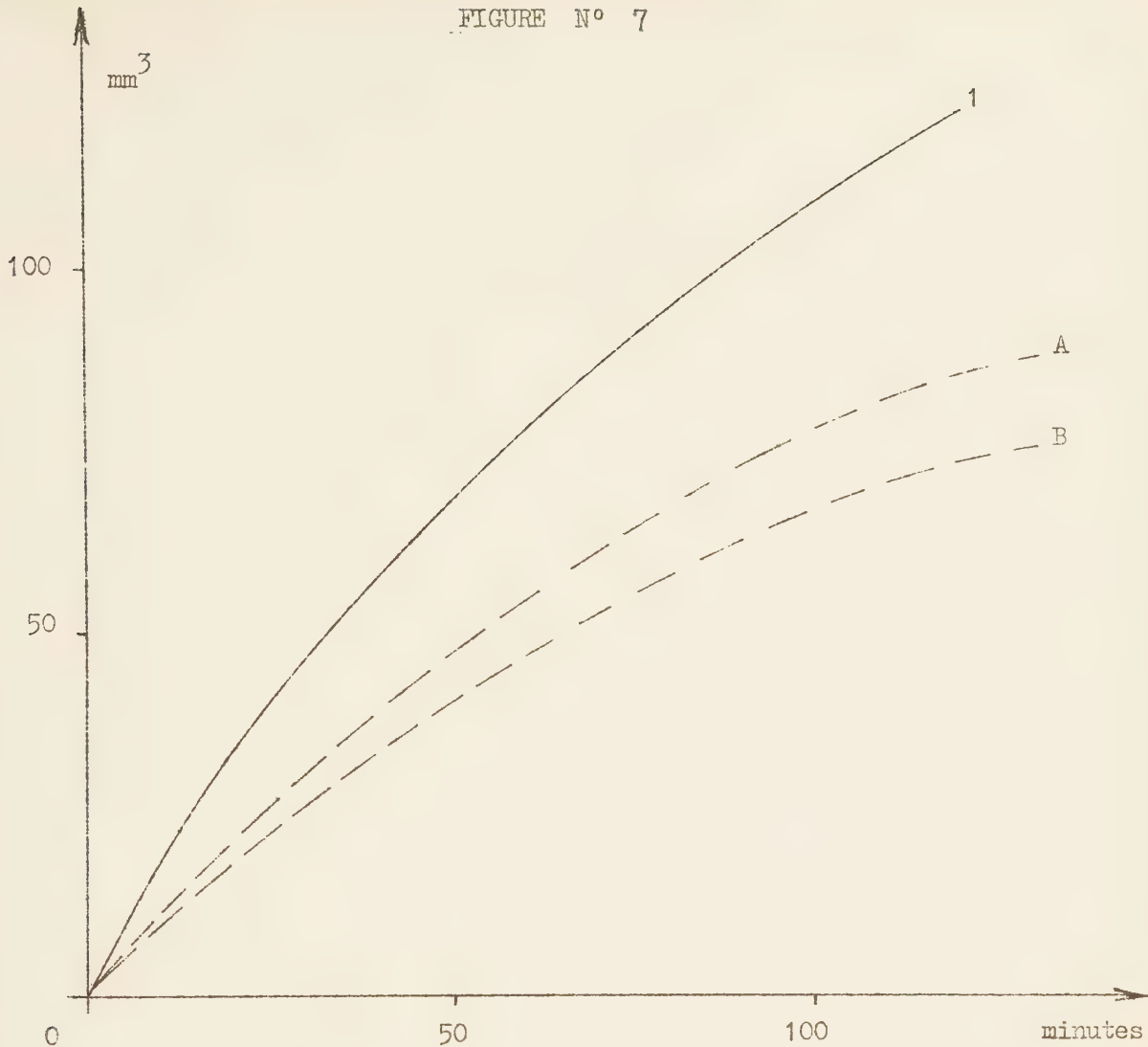
Madame J.

- Juillet I957 - Verrue café au lait noirâtre, excarée et saignante du pied droit.
 - Noevo carcinome vérifié histologiquement.
- Septembre I957 - Apparition de lésions satellites réalisant une pustulose mélanique avec éléments pigmentés et achromiques.
 - Curetage de plusieurs ganglions en Janvier I958.
- Mai I958
 - Etat local satisfaisant.
 - Diminution de la pustulose.
 - Serum prélevé à cette époque.
 - Résultats consignés sur la figure 5, Courbe 3.

Monsieur L. - 61 ans

- Mélanome du membre inférieur droit évoluant depuis 8 mois.
- Serum prélevé en Juillet I958, avant la Ière intervention (excision - greffe)
- Résultats rapportés dans la figure 7, Courbe A.

FIGURE N° 7



Courbe 1 : Limite inférieure d'oxydation du système en présence de serums normaux.

Courbes A et B : cinétiques en présence de serum pathologique.

Monsieur M. - 54 ans (Hôpital COCHIN)

- Mélanome ancien.
- Métastases hépatiques.
- Mélanurie.
- Résultats consignés sur la Figure 7, Courbe B.

TABLEAU RECAPITULATIF

Pourcentage de la tyrosine oxydée au bout de 45 minutes.

Témoin = tyrosine + tyrosinase animale = 100
 = tyrosine + tyrosinase animale + serums normaux = 60 à 83

Melle S. = = 43
 Monsieur B. = = 47 et 39
 Monsieur G. Charles = = 49
 Monsieur G. Montero = = 52 et 41
 Monsieur C. L. = = 22
 Monsieur M. = = 44
 Madame J. = = 43
 Monsieur L. = = 43
 Monsieur M. Lucien = = 38

Sur ces 10 cas de mélanomes, le pouvoir anti-tyrosinasique du sérum a toujours été nettement retrouvé. Aussi avons nous voulu nous assurer de la spécificité de cette inhibition :

Nous avons utilisé 5 serums prélevés sur des cancéreux viscéraux et 2 serums prélevés sur des sujets porteurs d'épithéliomas spino-cellulaires.

Dans les 7 cas, les serums se sont comportés comme des serums "normaux" et leur cinétique est venue s'inscrire entre les courbes 2 et 3 de la figure 8.

FIGURE N° 8



Courbe 1 : oxydation enzymatique de la tyrosine en présence de tyrosinase animale ;

Courbes 2 et 3 : courbes limites entre lesquelles se répartissent les cinétiques en présence de sérums normaux ;

Courbes 4, 5, 6 : cinétiques en présence de sérums cancéreux (épi. spino-cellulaires et cancer viscéral).

Le dernier serum de cancéreux étudié a été particulièrement intéressant. Il s'agissait en effet d'un homme opéré il y a 10 mois d'un mélanome de la région mammaire. L'Histologie aurait répondu "mélanome amélanotique". Ce malade vient dans le Service du Docteur de GRACIANSKY avec une hépatomégalie considérable et une atteinte extrême de l'état général.

Il était alors logique de parler d'une métastase hépatique du mélanome ancien. Le serum prélevé chez ce malade a montré un pouvoir inhibiteur normal.

L'autopsie pratiquée 15 jours plus tard montrait une carcinose miliaire généralisée, sans trace de métastases mélaniques.

Et l'Histologie n'a retrouvé qu'un épithélioma très indifférencié, ce qui serait un argument en faveur du pouvoir anti-tyrosinase non modifié dans le serum.

DISCUSSION

L'accroissement considérable du pouvoir inhibiteur du serum de sujets porteurs de mélanomes mérite une attention particulière. Un point nous paraît particulièrement important, c'est la spécificité de cette inhibition. Elle n'existe que pour les mélanomes et leurs métastases.

Dans tous les cas étudiés, la réaction a été positive, mais on ne peut pas en tirer argument sur la date d'apparition de cette action car dans tous ces cas, le diagnostic clinique était malheureusement évident. Il est toutefois clair que l'inhibition augmente au cours de l'évolution du mélanome.

Ce pouvoir inhibiteur est suffisant, dans les cas de mélanomes, pour être encore mesurable après dilution au 1/10 su sérum.

La non modification de ce pouvoir après dialyse, et sa disparition après déprotéinisation plaident en faveur de la nature protéique de l'inhibiteur.

S'agit-il alors de la présence d'une protéine anormale de type "ferment de défense", ou peut-on envisager l'existence d'une anti-tyrosinase ?

- Cette dernière hypothèse, la plus séduisante, a pour elle quelques arguments :

- spécificité de l'inhibition;
- comportement différent de la tyrosinase animale;

- augmentation de l'inhibition au cours de l'évolution

La séparation électrophorétique, objet de nos recherches actuelles, nous permettra, peut-être, de nous apporter des arguments nouveaux.

- Contre cette hypothèse il faut surtout reconnaître la difficulté d'admettre une anti-tyrosinase active à la fois vis-à-vis de l'enzyme élaboré par la tumeur et vis-à-vis de la tyrosinase de mélanome de cheval.

Un dernier point mérite d'être soulevé : l'action plus nette de l'inhibition vis-à-vis de la tyrosine que vis-à-vis de la dopa. La plus grande oxydabilité de cette dernière pourrait partiellement expliquer ce fait.

Enfin, on ne peut tirer d'arguments valables de l'emploi de serums vieillis, car les cultures apportent un accroissement de la consommation d'oxygène.

CONCLUSIONS

Si l'étude de la mélanogenèse in vitro est aujourd'hui bien connue, l'influence du serum humain sur l'oxydation de la dopa et de la tyrosine n'a fait l'objet que de recherches partielles et a donné souvent lieu à des résultats contradictoires.

Le serum humain a sur les différents modes d'oxydation de la tyrosine et de la dopa 3 actions différentes :

- Il active l'oxydation de la dopa par les métaux lourds.
- Il inhibe l'auto-oxydation de la dopa.
- Il a également une action inhibitrice sur des tyrosinases de différentes origines.

Le pouvoir activateur du serum est lié principalement au cuivre uni aux protéines.

Quant à l'action inhibitrice du serum sur la tyrosinase, elle est due à des protéines selon un mécanisme pas encore élucidé.

C. GRUPPER a mis en évidence par une méthode chimique une augmentation de l'action anti-tyrosinasique de serums de sujets porteurs de mélanomes.

Nous avons repris ce travail en utilisant une méthode manométrique permettant une mesure plus précise de l'activité anti-tyrosinase.

Nous avons confirmé que le serum de sujets porteurs de mélanomes présente une activité inhibitrice beaucoup plus intense que celle d'un serum normal.

Nous n'avons pas retrouvé ce phénomène chez d'autres cancéreux, ce qui témoigne de son caractère spécifique.

Nous avons constaté que l'inhibition de la tyrosinase de mélanome était de nature protéique et que son taux augmentait au cours de l'évolution du mélanome.

Le serum de ces sujets a une action spécifique vis-à-vis de la tyrosinase de mélanome de cheval, car on ne constate aucune augmentation de l'inhibition de la tyrosinase végétale par rapport à celle des serums normaux.

En mesurant le taux de cet effet inhibiteur sur 10 sérums, nous avons trouvé une réduction de l'activité tyrosinase comprise entre 50 et 80 % alors qu'elle n'est que de 17 à 35 %, dans les mêmes conditions, avec d'autres sérums

On peut évaluer que le pouvoir inhibiteur de serums de mélanomes est 2 à 3 fois plus élevé que celui de serums normaux.

La recherche du pouvoir antityrosinase du serum a cependant des applications cliniques encore restreintes : généralement trop tardive pour permettre un diagnostic précoce

elle peut cependant être utile en cas de suspicion de récurrence

Par contre par sa spécificité et peut-être son caractère immunologique, est elle susceptible d'aider à une meilleure connaissance pathogénique des mélanomes qui restent parmi les cancers les plus mystérieux et les plus graves.

Vu, le Président de Thèse
Professeur M.F. JAYLE

Vu, le Doyen de la Faculté
Professeur L. BINET

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

- (1) - LERNER (A.B), FITZPATRICK (T.B)
Physiol rev; (1950), N°I, 30
- (2) - ARNOW (L.E)
J of Biol chem; (1935), 110, 43
- (3) - ARNOW (L.E)
J of Biol chem; (1937), 120, 151
- (4) - BEZSSONOFF (N), LEROUX (H)
Bull Soc Chim Biol; (1946), 28, 286
- (5) - LEROUX (H)
Bull Soc Chim Biol; (1951), 31, 705
- (6) - HAAS (W.J), SIZER (I.W)
Biochem et Biophys Acta; (1950), 6, 601
- (7) - POLONOVSKI (M), GONNARD (P)
C.R Soc Biol; (1951), 145, 1612
- (8) - MASON (H.S)
Adv in Enzym; 19, 233, 79
- (9) - BLOCH (B)
Z.Physiol Chem; (1917), 98, 226
- (10)- KERTESZ (D)
Bull Soc Chim Biol; (1953), 35, 993
- (11)- GONNARD (P), ALLUCHON (C)
Bull Soc Chim Biol; (1954), 36, 1101
- (12)- GESSARD (M.C)
C.R Soc Biol (1902), 54, 551

- (13) - KERTESZ (D)
J Of nat Cancer Institute; (1954), 14 N°5, 1081
- (14) - HESSELBACH (M.L)
J of nat Cancer institute; (1951) 12 N°2, 337
- (15) - OHNISHI (E)
Zool. Soc of Japan (1954), 27 N°4
- (16) - POLONOVSKI (M), GONNARD (P)
Bull Soc Chim Biol (1953) 35 N°5, 6, 7
- (17) - MONDER (C), WILLIAMS (J.N), WAISMAN (J et H.A)
Arch of Biochem and Biophys (1958), 75, N°1
- (18) - HOLMBERG (C.G) et LAURELL (C.B)
Acta physiol. Scand. (1944), 8, 227
- (19) - HOLMBERG (C.G) et LAURELL (C.B)
Acta Chem Scand (1947), I, 944
- (20) - HOLMBERG (C.G) et LAURELL (C.B)
Acta Chem Scand. (1948), 2, 550
- (21) - HOLMBERG (C.G)
Nature (1948), 161, 236
- (22) - SHACTER (B)
Feder. Proc (1949), 8, I
- (23) - HORNYKIEWICZ (O), NIEBAUER (G)
Arch exper Path.Pharmakol; (1953), 218, 448
- (24) - ELSNER, HORNYKIEWICZ (O)
Arch für Gynäko; (1954), 185, 251
- (25) - KOLB (E)
Veterinär Physiol Chem Institut; Leipzig
(1956), 874
- (26) - GRIMSSON (H)
Proc of the Soc for Exp Biol and Med; (1957),
95, 476

- (27) - BOUDIN (G), PEPIN (B)
Revue du praticien (1954), 4, N°9
- (28) - SHEINBERG (I.H)
Science (1957), 126, N° 3279
- (29) - AKERFELDT (S)
Science (1957), 125, 117
- (30) - BEARN (A.G), KUNKEL (H.G)
Proc Soc exp Biol (1954), 85, 44
J Lab Clin Med (1955), 45, 623
- (31) - STARK (G.R) DAWSON (C.R)
Anal Chem USA; (1958, 30, N°2, 191
- (32) - FRANK (M.M), WURTMAN (R.J)
Proc Soc Exper Biol Med USA; (1958), 97,
N° 2, 478
- (33) - HUMOLLER (F.L)
Clinical Chem. (1958) 4, N°1
- (34) - URIEL (J), GRABAR (P)
Bull Soc Chim Biol; (1956), 38, 1253
- (35) - URIEL (J)
Bull Soc Chim Biol (1957) supp N°1, 105
- (36) - MORELL (A.G), SHEINBERG (I.H)
Science (1958), 127, N° 3298
- (37) - HESSELBACH (M.L)
J of nat Cancer institute; (1951), 12 N°2, 337
- (38) - AKERFELDT (S)
Science (1957), 125, 117
- (39) - ABOOD (L.G) , GIBBS (F.A et E)
A.M.A Arch Neurol Psych; (1957), 77, 643

- (40) - HOLMBERG (C.G)
Nature; (1948), 161, 236
- (41) - PORTER
Science (1957), 126, N° 3281
- (42) - MONDER (C), WILLIAMS (J.N), WAISMAN (J et HA)
Arch of Biochem and Biophys (1958), 75, N°1
- (43) - POLONOVSKI (M), GONNARD (P)
Bull Soc Chim Biol (1952), 35, N°5, 6, 7
- (44) - MONDER (C), WAISMAN (H.A), WILLIAMS (J.N)
Arch of Biochem and Biophys (1957), 72, 271
- (45) - OWEN (O), MARKERT (C.L)
J immunol; (1955), 74, 257
- (46) - GRUPPER (C)
Bull Soc Fr Dermatol; (1954), 61, 145
- (47) - SLOTTA, BRILL, FRANKENTHAL
O. Hospital (1953), 43, 523
- (48) - KRUGELIS (E.J); SIZER (I.W)
Am. J. Physiol; (1954), 176, 93
- (49) - KUBOWITZ (F)
Biochem. Z. (1937), 292, 221
- (50) - ARNOW (L.E.)
J. Biol Chem, (1935), 110, 43
- (51) - OTTAWAY
Bio Journal; (1958), 68, N°2, 239
-



AGEMP
POLYCOPIE

8, rue Dante
PARIS - V •

Téléphone : ODÉon 58-90